

**Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von
Betamethason-17-valerat
durch humanes Stratum corneum und organotypisches
Hautkonstrukt**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Svetlana Mitryaykina
aus Belaja Zerkov/Russland

1. Referentin: Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann
2. Referentin: Prof. Dr. Petra Mischnick
eingereicht am: 14.09.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.11.2007
Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Mitriaikina S., Müller-Goymann C. C., Synergetic effects of isopropyl alcohol (IPA) and isopropyl myristate (IPM) on the permeation of betamethasone-17-valerate from semisolid Pharmacopoea bases, J. Drug Del. Science Technology (2007) 17, 339-346

Mitriaikina S., Müller-Goymann C. C., Comparative permeation studies of non-diluted and diluted Betamethasone-17-valerate (BM-17-V) semisolid compositions through excised human stratum corneum and artificial skin construct (ASC) (Eingereicht)

Tagungsbeiträge

Mitriaikina S., Müller-Goymann C. C., Betamethasone-17-valerate (BM-17-V) Permeation through excised human stratum corneum from different topical formulations and their dilutions (Poster), 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva/Switzerland (2006)

Mitriaikina S., Müller-Goymann C. C., Penetrationfördernde Eigenschaften von Isopropylalkohol (IPA) und Isopropylmyristat (IPM) in dermalen 0,1% Betamethason-17-valerat (BM-17-V) Formulierungen (Poster), DPhG, Jahrestagung, Mainz (2005)

Für meine liebe Mama

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

Danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und die nette und persönliche Betreuung.

Frau Prof. Dr. P. Mischnick danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich weiterhin bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre und eine gute Zusammenarbeit sowie für die hilfsreiche Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Mein besonderer Dank hierbei dem Team des Zellkulturlabors für die Bereitstellung der Hautkonstrukte. Frau Jahn und Frau Schildt möchte ich für die Durchführung der Röntgenmessungen bzw. DSC-Messungen danken. Frau Handt möchte ich für die nette Zusammenarbeit an HPLC bedanken

Weiterhin danke ich:

Dr. P.-J. Flory aus der Plastische Chirurgie des Städtischen Klinikum Braunschweig, Holwedestrasse für die Hautspenden.

Firma Dermapharm AG (Grünwald, Germany) und Firma Essex Pharma GmbH (München, Germany) für die freundliche Überlassung von Fertigarzneimittel bedanken.

Zum Abschluss danke ich Frau Dr. Fadwa Hussein und Herrn Dr. Juan Ramon Villalobos Hernandez für die Unterstützung und das Korrekturlesen.

Speziell möchte ich mich auch bei meiner Mutter und Michael Fromm bedanken, die mich sehr unterstützt und begleitet haben.

Warenrechtlich geschützte Namen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Problemstellung	1
1.2. Ziele und Aufgaben	2
2. Allgemeiner Teil	4
2.1. Betamethason-17-Valerat	4
2.1.1. Wirkungsmechanismus von Glukokortikoiden (GK)	5
2.1.2. Nebenwirkungen von Glukokortikoiden	7
2.1.3. Problemrezeptur mit BM-17-V	8
2.2. Halbfeste Zubereitungen zur kutanen Anwendung	8
2.3. Die Haut	12
2.3.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	12
2.3.2. Morphologie des Stratum corneum	13
2.3.3. Lipidzusammensetzung des Stratum corneum	15
2.3.4. Physikochemische Eigenschaften des Stratum corneum und der Stratum corneum-Lipide	16
2.3.5. Permeationswege für Arzneistoffe	20
2.3.6. Absorption durch die Haut	21
2.3.7. Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser	23
2.3.8. Permeationsverbesserung durch Enhancer	24
2.3.9. Metabolisierung von Arzneistoffen in der Haut	30
2.4. Die Hautäquivalente und ihre Anwendung	31
3. Materialien und Methoden	33
3.1. Materialien	33
3.1.1. Arzneistoffe	33
3.1.2. Hilfsstoffe zur Herstellung halbfester Zubereitungen	33
3.1.3. Sonstige Stoffe	34
3.1.4. Verwendete Fertigarzneimittel	34
3.1.5. Verwendete kommerzielle Grundlagen	35

3.2. Methoden	36
3.2.1. Herstellung der verwendeten halbfesten Zubereitungen.....	36
3.2.2. Einarbeitung von IPA und IPM	38
3.2.3. Einarbeitung von Betamethason-17-valerat.....	39
3.2.4. Bestimmung der Sättigungskonzentration von Betamethason17-valerat in verschiedenen Lösungsmitteln.....	39
3.2.5. Bestimmung der Sättigungskonzentration von Betamethason-17-valerat in den Grundlagen	39
3.2.6. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten n-Oktanol/Wasser	40
3.2.7. Bestimmung der Phasenlage von Cremes	40
3.2.8. Karl-Fischer- Titration.....	40
3.2.9. Thermogravimetrie (TG)	40
3.2.10. Freisetzungsuntersuchungen	41
3.2.11. Permeationsuntersuchungen.....	42
3.2.12. Permeation durch künstliche Hautkonstrukte (Artificial skin constructs = ASC)	44
3.2.13.Extraktion des Stratum corneum.....	45
3.2.14. HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe	46
3.2.15. Dichtebestimmung.....	47
3.2.16. pH-Meter.....	47
3.2.17. DSC- Untersuchung.....	47
3.2.18. Bestimmung des pH-Optimums für die chemische Stabilität von BM-17-Valerat	48
3.2.19. Bestimmung der enzymatischen Metabolisierung von BM-17-Valerat	48
3.2.20. Bestimmung der Stabilität des BM-17-valerats in Salben und Cremes.....	49
3.2.21. Rheologie	49
3.2.22. Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)	49
3.2.23. Statistische Auswertung	50
3.2.24. Dünnschichtchromatographie (DC)	50
3.2.25. Prüfung auf Identität der fluorierten Kortikoide nach Ph.Eu.	51

4. Versuchsergebnisse und Diskussion.....	52
4.1. Dermale Systeme mit Betamethason-17-valerat für die topische Applikation.....	52
4.1.1. Sättigungslöslichkeit von BM-17-V in verschiedenen Lösungsmitteln	52
4.1.2. Charakterisierung der BM-17-V-haltigen halbfesten Zubereitungen aus DAB und DAC	52
4.1.3. Charakterisierung BM-17-valerathaltiger Fertigarzneimittel: Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe	54
4.2. Freisetzungsuntersuchungen	55
4.2.1. Freisetzungsuntersuchung von BM-17-V aus Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe	55
4.2.2. Freisetzungsuntersuchung von BM-17-V aus verschiedenen Grundlagen des DAB und DAC	56
4.3. Permeationsuntersuchungen von BM-17-V durch exzidiertes humanes Stratum corneum	59
4.3.1. Permeation von BM-17-V aus den Fertigarzneimitteln: Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe, Soderm® Salbe	59
4.3.2 Permeation von BM-17-V aus Grundlagen des DAB	60
4.3.3. Permeation von Betamethason, Betamethason-17-valerat und Prednisolon aus Basiscreme DAC im Vergleich	63
4.3.4. Einfluss der Verdünnung von BM-17-V-haltigen Zubereitungen auf das Permeationsverhalten des Wirkstoffs	64
4.3.5. Zusammenfassende Diskussion über das Permeationsverhalten von BM-17-V aus Cremen und Salben sowie aus ihren Verdünnungen durch exzidiertes Stratum corneum	70
4.4. Einfluss von Isopropylalkohol (IPA) und Isopropylmyristat (IPM) auf die Penetration von BM-17-V aus dermalen Zubereitungen und deren Einfluss auf die Stratum corneum Struktur.....	71
4.4.1. Permeation von BM-17-V aus Wollwachsalkoholsalbe mit und ohne Zusatz von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat.....	72

4.4.2. Permeation von BM-17-V aus Basiscreme DAC mit und ohne Zusatz von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat	74
4.4.3. DSC Untersuchung des exzidierten humanen Stratum corneum	76
4.4.4. Röntgenuntersuchungen (WAXD) von humanem Stratum corneum.....	83
4.4.5. Zusammenfassende Diskussion über die Wirkung von Isopropylmyristat und Isopropylalkohol sowie ihrer Kombination auf das Permeationsverhalten von BM-17-V	86
4.5. Untersuchung der BM-17-V-Permeation und der Permeation anderer Kortikosteroide aus Emulsionen.	88
4.5.1. Permeationsuntersuchungen.....	88
4.5.2. DSC Untersuchung	90
4.5.3. Röntgenmessungen des Stratum corneum, vorbehandelt mit unterschiedlichen Grundlagen	92
4.6. Nerzöl in Dermatika	94
4.6.1. „nachgebaute“ Variationen im Vergleich zum Originalprodukt Müstella Creme	95
4.6.2. Permeation von BM-17-V aus der Müstella Variation im Vergleich zu Basiscreme DAC und zu Müstella Creme	95
4.6.3. Einfluss von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat auf das Permeationsverhalten von BM-17-V aus einer Nerzölemulsion	98
4.6.4. DSC-Untersuchung des exzidierten humanen Stratum corneum	99
4.6.5. WAXD-Untersuchung	101
4.6.6. Permeation von Hydrokortison aus kommerziellen Produkten im Vergleich	102
4.6.7. Zusammenfassende Diskussion über Nerzöl in Dermatika	103
4.7. Permeationsuntersuchung durch organotypische Hautäquivalente	104
4.7.1. Permeation von BM-17-V aus dermalen Zubereitungen durch SC und Hautäquivalente im Vergleich	105
4.7.2. Zusammenfassende Diskussion für die Permeation von BM-17-V durch Hautäquivalente ASC	109
4.8. Wirkstoffmetabolisierung	111

4.8.1. Metabolisierung von BM-17-V bei unterschiedlichen pH-Werten mit und ohne Hautkonstrukte.....	111
4.8.2. Metabolisierung von BM-21-V bei unterschiedlichen pH-Werten mit und ohne ASC	117
4.8.3. Zusammenfassende Diskussion der Metabolisierungsuntersuchungen	118
4.9. Lagerstabilitätsuntersuchung von BM-17-V in dermalen Zubereitungen..	119
4.9.1. Stabilität von BM-17-V in der Basiscreme DAC	120
4.9.2. Stabilität von BM-17-V, BM, Prednisolon in Basiscreme DAC.....	121
4.9.3. Stabilität von BM-17-V in der Basiscreme DAC mit geringerem Wasseranteil	123
4.9.4. Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen	124
5. Abschlussdiskussion	126
5.1.Freisetzungsuntersuchungen	126
5.2. Permeationsverhalten von BM-17-V aus Cremes und Salben, sowie aus ihren Verdünnungen durch exzidiertes Stratum corneum	127
5.3. Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf die Permeation von BM-17-V durch Stratum corneum	129
5.4. Effekt unterschiedlicher Hilfsstoffe auf die Mikrostruktur der Hornschicht	131
5.5. Permeation durch organotypische Hautäquivalente	134
5.6. Evaluierung der Hautäquivalente für Biotransformationsuntersuchungen	136
5.7. Stabilitätsuntersuchungen	137
6. Zusammenfassung	138
7. Literaturverzeichnis	141

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Neurodermitis (atopische Dermatitis oder atopisches Ekzem) ist eine nicht heilbare Erkrankung, unter welcher 2,5 Millionen Menschen in Deutschland leiden. Juckreiz und Kratzen als häufigste Symptome der Krankheit führen zu immer stärkerer Zerstörung der Haut und damit zu häufig auftretenden kutanen Komplikationen, da die Haut keine funktionierende Schutzmembran mehr hat. Die qualitative und quantitative Veränderung der Lipidzusammensetzung, ein verkürzter Lebenszyklus der Korneozyten und die Verwendung von ungeeigneten Kosmetika zur Hautreinigung und -pflege sind Gründe für die Störung der natürlichen Barrierefunktion der Haut. Zusätzlich können Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* durch sezernierte Toxine eine Entzündung chronifizieren [Höger und Schön, 2007]. Die Therapie entzündlicher Hautkrankheiten wie Ekzeme, Psoriasis, Erythema nodosum, Strahlenerythem, Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses, Pemphigus), entzündlicher Lichtdermatosen erfolgt mit topischen und/oder systemischen Arzneimitteln, die entzündungs- und/oder proliferationshemmende sowie immunsuppressive Eigenschaften haben müssen. Somit kommen Glukokortikoide im topischen Ansatz in Frage. Bei akut nässenden Hautzuständen sind Zubereitungen mit einem möglichst hohen Wasseranteil zu empfehlen, während bei chronisch-hyperkeratotischen Zuständen eher fette Pflege geeignet ist, denn diese wirkt hydratisierend [Daniels, 2007]. Die Entwicklung einer optimal geeigneten Zubereitung mit optimalen Pflegeeffekten, hoher Kompatibilität mit dem Wirkstoff und einer maximalen therapeutischen Wirkung ist eine Herausforderung für den Pharmazeuten. Problematisch ist vor allem die Auswahl der Hilfsstoffe sowie ihrer Konzentrationen. Tenside z.B. erhöhen den transepidermalen Wasserverlust, was für chronische Erkrankungszustände nicht erwünscht ist. Auch die chemische Stabilität des Wirkstoffes in der Zubereitung muss berücksichtigt werden. Betamethason-17-valerat z.B. neigt in wässrigen Zubereitungen zur Umwandlung in weniger wirksamer Ester, was den therapeutischen Effekt der Zubereitung reduziert [DAZ, 2004]. In der Literatur wurden die Permeationseigenschaften von Hydrocortison (HC)-Fertigarzneimitteln ausführlich beschrieben. In Arbeiten von Alberg (1998), Refai (2001) und Brinkmann (2006) erwiesen sich verschiedene Fertigarzneimittel, mit Ausnahme der Grundlage Soventol® Creme, hinsichtlich des Permeationsverhaltens von HC als gleichwertig. Refai (2001) und Brinkmann (2006) haben gezeigt, dass Verdünnungen von HC- und Prednicarbat-Zubereitungen zu keiner Reduzierung der Permeation führen. Aus der Kenntnis über Soventol® Creme entwickelte sich das Interesse, den Einfluss der darin enthaltenen Hilfsstoffe auf die Lipidstruktur der Hornschicht (Stratum corneum (SC)) zu erforschen. Der Effekt von einigen Hilfsstoffen z.B.

(Glycerol, Propylenglykol, Isopropylalkohol (IPA), Isopropylmyristat (IPM)) auf die SC-Mikrostruktur und auf das Permeationsverhalten von HC wurde daher weiter erforscht. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sollten mit denen für HC verglichen werden.

Ein weiteres Problem bei der Entwicklung einer Zubereitung zur topischen Anwendung ist eine Prüfung auf ihre therapeutische und toxische Wirkung an Tieren. Die Kosmetikrichtlinie (2003) besagt, dass in Zukunft nur noch *in vitro* Methoden statt Tierversuchen zur Durchführung der sicherheitstoxikologischen Prüfung und Entwicklung von Kosmetika eingesetzt werden dürfen. Daher müssen Zell- und Organkulturen auf wissenschaftlich fundierter Basis entwickelt werden (z.B. artifizielle Hautkonstrukte, ASC), die als absoluter Standard für unterschiedliche Experimente einsetzbar sind. Obwohl ASC eine größere Permeabilität im Vergleich zu SC besitzen, konnte trotzdem die gleiche Permeationsrangfolge eines Wirkstoffes aus unterschiedlichen Formulierungen ermittelt werden [Specht et al., 1998; Winkler und Müller-Goymann, 2002]. Auch andere Studien an künstlichen Lipidbarrieren [Jaeckle et al., 2003, Bouwstra et al., 2006] haben die mögliche Anwendung der Systeme gezeigt.

1.2.Ziele und Aufgaben

Die folgende Arbeit ist dem Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von Betamethason-17-valerat (BM-17-V) durch humanes Stratum corneum und ein humanes Hautmodell gewidmet. Das erste Ziel ist die Untersuchung von BM-17-V hinsichtlich seines Permeationsverhaltens aus Fertigarzneimitteln, DAB-Grundlagen und deren Verdünnungen und die eventuelle Erhöhung der Permeabilität der Zubereitungen durch den Einsatz von unterschiedlichen Enhancern. Mit der vorliegenden Arbeit soll das Thema des Enhancer-Effekts am Beispiel von IPA und IPM sowie weiterer Hilfsstoffe wie z.B. Nerzöl weiter geklärt werden. Zusätzlich soll in dieser Arbeit die Enhancerwirkung in unterschiedlichen wasserfreien und wasserhaltigen Zubereitungen auf BM-17-V gezeigt und mit Hilfe der DSC- und Röntgenuntersuchungen an SC geklärt werden.

Als weiteres Ziel sollen organotypische Hautmodelle (ASC) hinsichtlich der Permeation und Metabolisierung von BM-17-V bearbeitet werden.

Zur Erreichung der genannten Ziele sind folgende Aufgaben zu erfüllen:

- Charakterisierung der Liberations- und Permeationseigenschaften von BM-17-V aus unterschiedlichen halbfesten Zubereitungen und Vergleich des Permeationsverhaltens mit dem von Fertigarzneimitteln
- Untersuchung des Effektes der Verdünnung des Vehikels auf das Permeationsverhalten des Wirkstoffes

-
- Vergleich der Permeationseigenschaften von BM-17-V für SC und ASC durch *in vitro*-Permeationsexperimente unter Berücksichtigung der chemischen Stabilität des Wirkstoffes und Evaluierung beider Permeationsmodelle für Permeationsuntersuchungen
 - Steigerung der dermalen Verfügbarkeit von BM-17-V durch Modifizierung des Vehikels und Aufklärung der Wirkmechanismen der penetrationsfördernden Hilfsstoffe mit Hilfe strukturanalytischer Untersuchung
 - Evaluierung der beiden Permeationsmodelle SC und ASC für Metabolisierungsuntersuchungen
 - Charakterisierung der Stabilitätseigenschaften von BM-17-V hinsichtlich des pH-Optimums und der Lagerungstemperatur

2. Allgemeiner Teil

2.1. Betamethason-17-Valerat

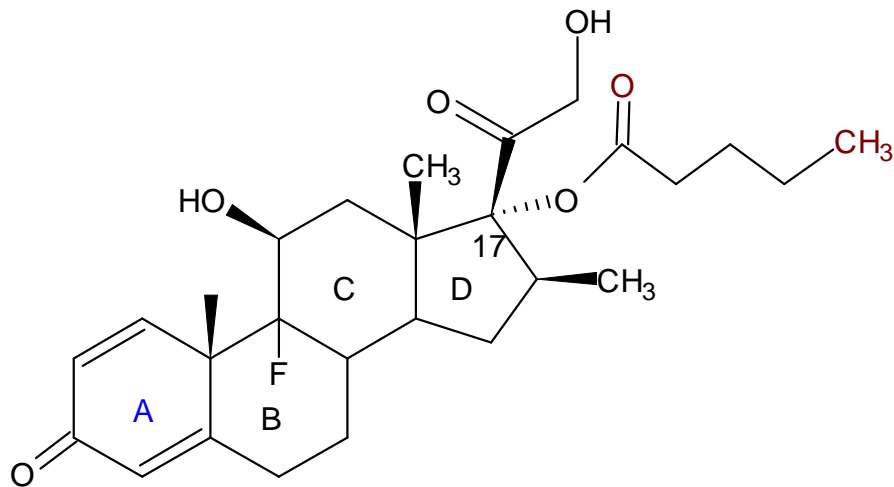


Abbildung 1: Strukturformel von Betamethason-17-valerat

BM-17-V gehört zu den monofluorierten Glukokortikoiden (GK) der 2. Generation (Abbildung 1).

Vor der Markteinführung der Valisone® Creme (0,1 % BM-17-V) in 1967, die zu einem Durchbruch in der dermalen Kortikoidtherapie führte, wurden die Kortikosteroide hauptsächlich parenteral bzw. peroral angewendet. Die damaligen dermalen Zubereitungen mit Hydrocortison und Dexamethason hatten keine zufriedenstellenden anti-inflammatorischen Effekte gezeigt. Die therapeutische Wirkung von Valisone® war wesentlich stärker und somit begann die Erfolgsgeschichte von BM-17-V [Samson et al., 1992]. Betamethason (BM), ein Vorgänger des BM-17-V, war von der Schering Korporation entwickelt und für die systemische Wirkung 1961 als orale Arzneiform (Celestone® Tabletten) eingeführt worden. Obwohl bis dahin noch keine direkte Korrelation zwischen einer systemischen und lokalen Wirkung nachgewiesen worden war, wurde BM 1964 in Celestone® Creme eingesetzt. Erst die Forschungsgruppe von McKenzie-Stroughton hat die hydrophile Hydroxyl-Gruppe in der Position 17 bzw. 21 mit einer Fettsäure verestert und so die Vasokonstriktoraktivität sowie die Wirkungspotenz verbessert. Später wurde festgestellt, dass das 21-Derivat im Vergleich zum 17-Derivat eine geringere Wirkung in der Psoriatheapie zeigt.

BM-17-V ist unter den Kortikoiden aufgrund seiner Reaktivität ein besonders problematischer Vertreter im Bezug auf seine chemische Stabilität. Es können unterschiedliche Abbauprozesse stattfinden (Abbildung 2). Wie alle Steroid-17 α -Monoester

1

2

3

BM als Zersetzungsprodukt von BM-17-V zerfällt unter alkalischen, anaeroben Bedingungen bevorzugt in saure Produkte. Die dabei entstehenden Hauptzersetzungsprodukte sind die C-17-Deoxy-17-carbonsäure sowie C-17-Deoxy-20-hydroxy-21-carbonsäure [Neumayer, 1999].

GK weisen im Organismus eine Vielzahl von Effekten auf [Lubach und Kietzmann, 1992]. Dabei wird die Reaktion des Kortikosteroids mit einem cytoplasmatischen Rezeptor postuliert, die zu einer Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes führt. Der so veränderte Komplex bindet sich dann im Zellkern an Chromatin und beeinflusst die Transkription von Messenger-RNS. Dabei können Steroide offenbar die Transkription sowohl stimulieren als auch hemmen. Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht bekannt, wohl aber eine ganze Reihe von messbaren Effekten auf zelluläre Funktionen. Der

bekannteste Effekt – daher der Name „Glukokortikosteroide“ – ist die Wirkung auf den Glukosestoffwechsel, die in einer Mobilisierung von Muskelglycogen und Gluconeogenese aus Aminosäuren besteht. Für die dermatologische Therapie von besonderem Interesse sind jedoch die antiinflammatorischen Effekte. Einen wesentlichen Anteil an der antiinflammatorischen Wirkung der GK hat eine nicht direkte Hemmung der Phospholipase A_2 aufgrund der resultierenden verminderten Freisetzung von Arachidonsäure und der reduzierten Bildung von Eikosanoiden (Prostaglandinen und Leukotrienen), welche als Entzündungsmediatoren dienen [Brain und Williams, 1989; Dunn und Willoughby, 1989; Marshall und Chang, 1990; Schäfer-Korting et al., 2005]. Die hochaktiven Leukotriene wie Leukotrien C₄, D₄ und E₄ entstehen über die Lipoxygenase und weisen eine Aktivität im Sinne von „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) auf [Ring, 1982]. GK gelangen durch passive Diffusion in die Zelle. Dort werden die GK an Zytosolrezeptoren gebunden [La Pointe und Baxter, 1989]. Aktivierte zytosolische GK-Rezeptoren wandern in den Zellkern und führen zu einer Blockade von Transkriptionsfaktoren: NFκB (nuclear factor kappa B) und AP-1 (activator protein). Die Wirkung der GK ist abhängig von der RNS- und Proteinbiosynthese [Danon und Assouline, 1978]. Die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch GK wird auf diesem Wege induziert. Unter der Einwirkung von GK produzieren zahlreiche Zellen z.B. (neutrophile Granulozyten, Makrophagen) Proteine z.B. (Lipomodulin, Macrokortin, Renokortin) mit Phospholipase A_2 -hemmender Aktivität [Flower, 1989], welche seit 1984 unter dem Namen Lipokortine zusammengefasst wurden [Flower, 1984]. Die glukokortikoidabhängige Hemmung der Expression von Genen beruht meistens auf indirekten Effekten wie der Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 [Eberhardt und Kilz, 2003]. Dies führt zur Hemmung der Expression vieler proinflammatorischer und immunstimulierender Gene wie iNOS (induzierbare NO-Synthase), verschiedener Interleukine (IL) und Adhäsionsmoleküle. Die starke entzündungshemmende und immunsuppressive Aktivität der GK ist auf molekularer Ebene letztendlich darauf zurückzuführen, dass die Expression entzündungsfördernder und immunstimulierender Gene gesenkt wird, während die Expression entzündungshemmender und immunsuppressiver Gene gesteigert wird.

So stellen die prostaglandinvermittelte Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität im Rahmen der Ödembildung sowie die Beteiligung an Schmerzreaktionen wichtige Wirkungen der Prostaglandine dar.

Ein weiterer wichtiger pharmakologischer Effekt der GK ist die Immunsuppression [Parillo und Fauci, 1979; Goldsmith et al. 1989]. GK führen zu einer Umverteilung von T-Lymphozyten im Organismus, was deren Abnahme in der Peripherie zur Folge hat. Sie hemmen außerdem die chemotaktisch bedingte Leukozyteninfiltration und die Freisetzung

lysosomaler Enzyme [Block et al. 1982]. Die in den T-Lymphozyten ablaufende Synthese verschiedener Lymphokine (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IFN γ , GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)) wird ebenfalls durch GK vermindert. IL-1 aktiviert die Phospholipase A₂ und induziert damit die gesteigerte Bildung von Eikosanoiden, auch diese Reaktion wird durch GK unterbrochen [Vadas und Pruzanski, 1990].

Für die immunsuppressive Wirkung scheint u.a. die verminderte Transkription der sogenannten inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α (tumour necrosis factor) (in Monozyten/Makrophagen und von IL-2 in T-Zellen von Bedeutung zu sein. Zwischen den Eikosanoiden und den Zytokinen bestehen Interaktionen. Prostaglandin E₂ und I₂ erniedrigen z.B. die IL-2-Synthese. Die Inhibierung der 5-Lipoxygenase hat wiederum eine verminderte IL-2 und IFN γ - Sekretion zur Folge, was die antiinflammatorische Wirkung erhöht [Bickers et al., 1984; Lloyd, 1990].

2.1.2. Nebenwirkungen von Glukokortikoiden

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen unter der topischen Therapie mit GK korrelieren einerseits positiv mit der verwendeten Wirkstärke, sind andererseits aber auch von der Dauer und der Lokalisation der Anwendung abhängig. Die am häufigsten beschriebenen Nebenwirkungen umfassen Hautatrophien, Teleangiektasien, Striae, Hypertrichose, das Auslösen einer Steroidakne oder perioralen Dermatitis im Gesicht [Rivara et al., 1989; Gerdes und Mrowietz, 2006].

Da die Lederhaut im Wesentlichen aus Fibroblasten und deren sekretorischen Produkten, z.B. Kollagen und Glykosaminoglykanen aufgebaut ist, muss die Wirkung der GK auf diese Strukturelemente berücksichtigt werden. Unerwünschte Effekte von Kortikosteroiden bestehen in der Ausdünnung der Haut aufgrund der Inhibition der Keratinsynthese von epidermalen Zellen [Radoja et al., 2000; Schäfer-Korting et al., 2005]. Außerdem sind eine Störung der Proliferation der Fibroblasten und eine Störung des Kollagen-Metabolismus in der Dermis die größten Nachteile der Glukokortikoide, die bei der Behandlung auftreten können [Korting et al., 1995; Schäfer-Korting et al., 2005]. Die Hemmung der Hyaluronsäuresynthese mag beide Eigenschaften von Kortikoiden widerspiegeln: die antiphlogistische und die atrophisierende [Hopsu-Havu und Saarni, 1980]. Wenn der Steroidrezeptor blockiert wird, sind die Zellen gegenüber einer neuen Steroiddosis nicht mehr empfindlich [Ponec, 1980].

Für die Praxis wurde empfohlen, die Wahl der zu verwendenden Wirkklasse, die entsprechende Grundlage und die Dauer der Anwendung an die Lokalisation und den Hautbefund anzupassen [Gerdes und Mrowietz, 2006].

2.1.3. Problemrezeptur mit BM-17-V

Eine rezepturmäßige Verarbeitung von BM-17-V kann problematisch sein in Bezug auf die Wirkstoffstabilität. Eine verminderte Qualität der hergestellten Formulierungen kann verschiedene Gründe haben. Das ist zum Einen die Qualität der Ausgangsstoffe. Bei der Wahl der Hilfsstoffe ist für den Apotheker außerdem die Berücksichtigung von möglichen Inkompatibilitäten notwendig. Ein weiteres Problemfeld ist die ausreichende Konservierung der hergestellten Produkte. Von einer optimalen Konservierung hängt die zu erwartende mikrobielle Stabilität der Zubereitungen ab. Außerdem können die chemische und physikalische Stabilität durch unsachgemäße Lagerung negativ beeinflusst werden.

BM-17-V ist ein instabiles Kortikoid. Eine Kombination mit der Basiscreme DAC wurde in der DAZ (2004) aus diesen Gründen als Problemrezeptur eingestuft. In dieser häufig verschriebenen Rezeptur wandelt sich der Wirkstoff in den weniger wirksamen 21-Ester um, wobei die hergestellte Rezeptur nur noch 15 % der Wirksamkeit des 17-Valerats behält. Daher wurde für die Rezeptur eine Citratpufferzugabe zur Stabilitätssteigerung des Wirkstoffes empfohlen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stabilitätsaspekt weiter untersucht und nach einer Lösung gesucht.

2.2. Halbfeste Zubereitungen zur kutanen Anwendung

Wie allgemein bekannt ist, können die wirkstofffreien Zubereitungen selbst bereits zur Dermatosenbehandlung eingesetzt werden, da sie direkt mit dem Zielorgan Haut in Kontakt kommen und einen Effekt ausüben. Das Vehikel verändert über einen Kühleffekt oder Wärmestau den Hautzustand. Leider ist es zur Zeit noch nicht möglich, das hinsichtlich der Liberation beste Vehikel für ein bestimmtes Kortikoid vorherzusagen. Daher muss die Liberation im Vorfeld experimentell bestimmt werden.

Halbfeste Zubereitungen zur kutanen Anwendung sind gemäß Ph. Eur. Darreichungsformen, die im Allgemeinen im Temperaturbereich zwischen Raumtemperatur (18 °C) und Hauttemperatur (32 °C) streichfähig sind. Ihre Anwendung erfolgt auf der Haut oder Schleimhaut. Die Systematik der halbfesten Zubereitungen kann nach verschiedenen Aspekten erfolgen. So können pharmazeutisch-technologische Gesichtspunkte, wie die Art

der Wirkstoffverteilung im Trägermedium (Lösungssalben, Emulsionssalben, Suspensionssalben) herangezogen werden. Auf der andere Seite können auch dermatologische Aspekte (Decksalben, Schutzsalben, Penetrationssalben, Resorptionssalben) Berücksichtigung finden. Allen halbfesten Zubereitungen ist gemeinsam, dass es sich um kolloide Systeme handelt. Ihr halbfester Zustand und damit ihre Konsistenz können auf den Gel-Zustand zurückgeführt werden, z.B. wurden Salben als plastische Gele zur kutanen Applikation eingeordnet. Dabei ist der plastische Zustand dieses Systems dadurch charakterisiert, dass es eine Fließgrenze aufweist. Nach Bauer und Führer werden die halbfesten Systeme folgendermaßen unterteilt:

1. Wasserfreie Systeme, Salben:

Hydrophobe Salben

(*Kohlenwasserstoffgele*) Die Vaseline z.B. stellt ein Gemisch aus flüssigen und festen gereinigten, gebleichten und gesättigten Paraffinkohlenwasserstoffen dar, für welche ein parakristalliner Zustand postuliert wird. Von dieser Hypothese lässt sich die Vorstellung der Bildung sogenannter „Fransenmizellen“ ableiten. Die Paraffinmoleküle lagern sich parallel zueinander an, so dass sich entsprechende Atome in ganz bestimmten Abständen exakt nebeneinander befinden. Die einzelnen Moleküle durchlaufen geordnete (kristalline) Bezirke und ungeordnete (amorphe) Bereiche. Nach Häusler (1989) lässt sich für Vaseline folgendes Strukturmodell aufstellen (Abbildung 3). Die Kristalle der Vaseline haben prinzipiell den Charakter von Lamellenstapeln. Die einzelnen Lamellen besitzen einen dichten kristallinen Kern mit einer Dicke von 3,8 nm, was der mittleren Länge der n-Alkane in der Vaseline entspricht. Der Rest der Lamellen wird durch zwei dicke Deckschichten im Glaszustand der Kohlenwasserstoffmoleküle gebildet. Mehr als 25 % der Gesamtmasse der Vaseline befinden sich innerhalb der Lamellenstapel, der Rest liegt frei, in flüssiger Form vor und wird durch das Kristallinat immobilisiert.

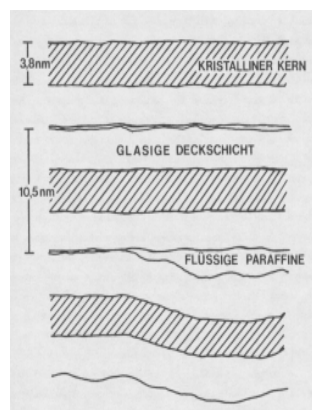


Abbildung 3: Idealmodell des kolloiden Aufbaus der Vaseline (nach Häusler 1989)

(*Lipogele*) Triglycerid-Grundlagen bestehen aus mit Glycerol veresterten Fettsäuren. Die Kettenlänge sowie die Anzahl an ungesättigten Bindungen bestimmen die Konsistenz der Triglyceride. Die veresterten Fettsäuren sind v.a. Palmitin-, Stearin- und Ölsäure. Der Aufbau der Formulierung ist ähnlich den Kohlenwasserstoffgelen. Fette mit langkettigen, gesättigten Fettsäuren zeigen einen lamellaren Kristallgitteraufbau.

(*Oleogele*) sind Grundlagen mit hochdispersem Siliciumdioxid als gerüstbildender Komponente und geeigneten lipophilen flüssigen Bestandteilen wie Silikonölen oder Mineralölen. Beim Aufbau der Gelstruktur mit hochdispersem Siliciumdioxid spielen Wasserstoffbrückenbindungen, die direkt über die Silanolgruppen zweier Teilchen gebildet werden, eine Rolle. Das resultierende Gelgerüst zeigt einen netz- bis wabenförmigen Aufbau.

Hydrophile Salben

(*Polyethylenglykolgele*) sind sogenannte Isogele, in welchen feste und flüssige Komponenten die gleiche chemische Struktur besitzen und sich nur in Molmassenverhältnissen unterscheiden.

(*Absorptionsgele*) enthalten W/O-Emulgatoren, wie Wollwachs, Wollwachsalkohole und/oder Fettalkohole. Die Struktur wird in Abbildung 4 dargestellt. In der Formulierung enthaltener Cetystearylalkohol kristallisiert in den geschmolzenen Paraffinkohlenwasserstoffen beim Erstarren in einer fibrillären Struktur unter Ausbildung bestimmter bevorzugter Wachstumsrichtungen. Es resultiert ein feingliedriges dreidimensionales Netzwerk, das als Nebenvaleenzengel aufzufassen ist, in dem die flüssigen Komponenten durch Lyosorption oder mechanischen Einschuss oder Kapillarkwirkung immobilisiert sind.

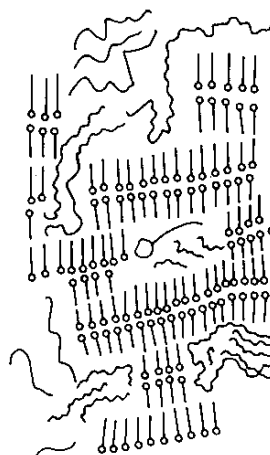


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines aus Fettalkoholen, Paraffinkohlenwasserstoffen aufgebauten W/O-Adsorptionsgels nach Führer et al., 1978

—□ Fettalkohol, ≈ Paraffinkohlenwasserstoffe

2. Wasserhaltige Systeme, Cremes und Hydrogele:

Einphasige Systeme wie *Hydrogele* (mit anorganischen und organischen Gelbildnern) sind von mehrphasigen wasserhaltigen Systemen, den Cremes abzugrenzen. Cremes sind komplexe kolloidchemisch aufgebaute Systeme, die Wasser enthalten. Man unterscheidet hydrophile, lipophile (hydrophobe) und amphiphile Cremes. Das Wasseraufnahmevermögen steigt nicht mit zunehmendem Emulgatorgehalt, sondern bestimmte optimale Emulgatorverhältnisse zueinander sind die Voraussetzung für ein maximales Wasseraufnahmevermögen.

Eine schematische Darstellung solcher Systeme wird in Abbildung 5 dargestellt. Wegen des hohen Wassergehalts und der damit verbundenen günstigen rheologischen Eigenschaften sind diese Systeme als Dermatika und Kosmetika weit verbreitet. Die Fettphase besteht bei diesen Systemen überwiegend aus Vaseline, flüssigen Paraffinen und Triglyceriden mit mittelkettigen Fettsäuren. Das enthaltene Wasser wird interlamellar gebunden.

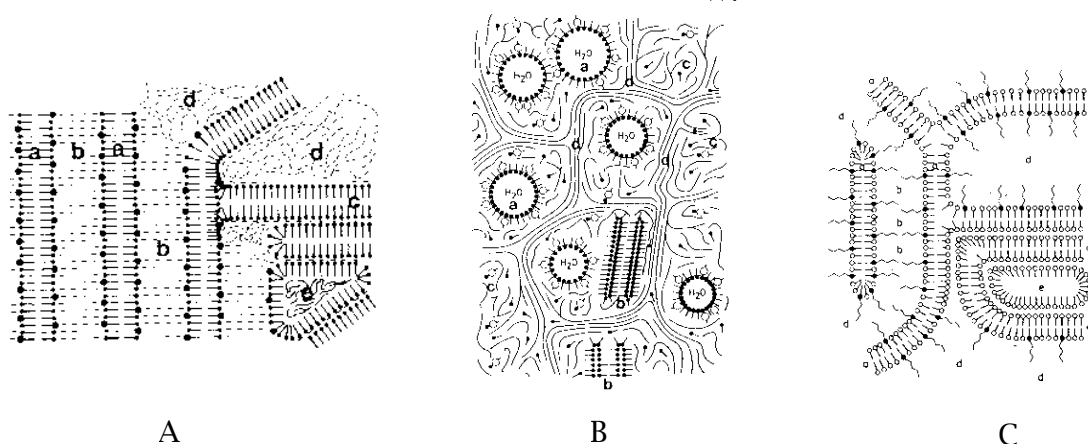


Abbildung 5: A Schematische Darstellung der Gelstrukturen in der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe. a) Hydrophiles Gelgerüst (Mischkristall aus Cetylstearylalkohol und Cetylstearylalkoholsulfat); b) hydrophiles Gelgerüst (interlamellar eingelagertes Wasser); c) Cetyl-stearylalkohol-Semihydrat-Gelgerüst; d) Bulk-Wasserphase; e) lipophile disperse Phase [Junginger et al., 1981]

B Schematische Darstellung von Wasserhaltiger Wollwachsalkoholsalbe; a) Wassertröpfchen, durch Mischemulgatorsystem stabilisiert; b) Überschlußkristallisatemulgatoren; c) lipophile flüssige Phase mit gelösten Emulgatormolekülen; d) lipophile Gelphase [Junginger, 1991]

C Wasserhaltige nichionische Hydrophile Creme; a) Mischkristall aus nicht-ionogenem O/W-Emulgator und Cetylstearylalkohol; b) interlamellar fixiertes Wasser, c) lipophile Gelphase (hauptsächlich Cetylstearylalkohol); d) Bulkwasser, e) lipophile disperse Phase [Junginger, 1991]

2.3. Die Haut

2.3.1. Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist ein lebenswichtiges Organ, das den menschlichen Organismus von der Umwelt abgrenzt und ihn vor äußeren Belastungen schützt. Mit einer Fläche von 1,5 bis 2,0 m² beim Erwachsenen ist die Haut das größte Organ des Menschen. Sie besteht aus einer zellreichen und mehrschichtigen *Epidermis* mit dem *Stratum corneum* (SC) zuoberst und den *Basalzellen* zuunterst und aus dem zellarmen *Corium* mit verschiedenen Hautanhangsorganen und Blutgefäßen (siehe Abbildung 6). Darunter befindet sich die *Subcutis* mit Fettzellen und schließlich das Muskelgewebe. Trotz ihres komplexen Aufbaues lässt sich die Barriere des *Stratum corneum* stark vereinfacht als eine isotrope lipophile Verteilungsmembran vorstellen [Voigt, 1993].

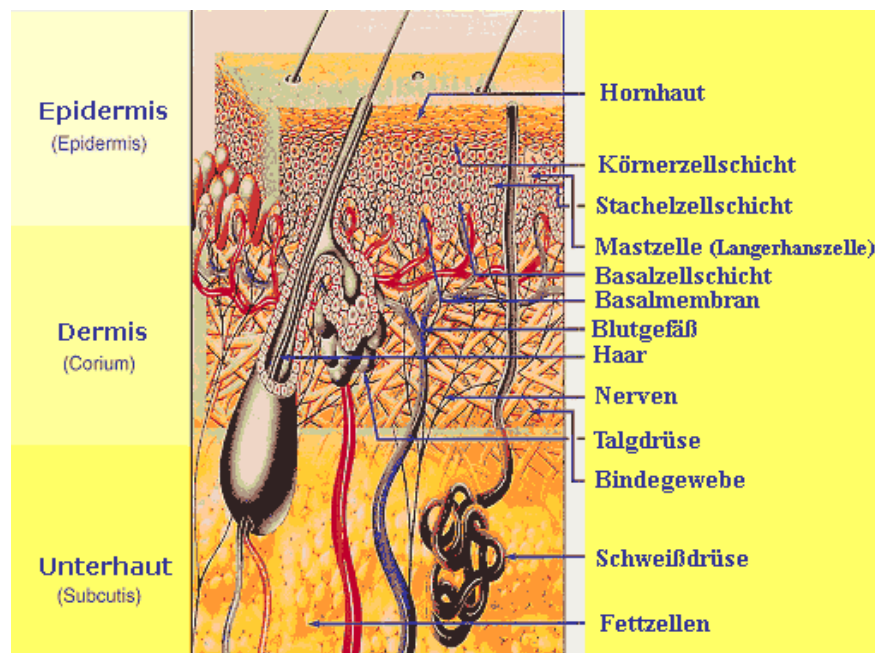


Abbildung 6: Aufbau der menschlichen Haut [<http://www.hermal.com>]

Die Haut ist elektrisch polar und verhält sich wie eine außen negativ geladene Membran. Die *Epidermis* enthält keine Blutgefäße und ist je nach Lage 0,03 (Kopf, Brust, Arme) bis 1 mm (Fußsohlen, Handflächen) dick. Sie ist eine der dichtesten Diffusionsbarrieren des Organismus, die wiederum in mehrere funktionelle Zellschichten untergliedert wird. Der physiologische Ausgangspunkt ist das Stratum basale, dem sich das *Stratum spinosum*, das *Stratum granulosum* und als äußerste Schicht der Epidermis das *Stratum corneum* (Hornschicht) angliedern. Das *Stratum corneum* besteht aus 10 bis 30 Lagen enddifferenzierten, kernlosen Epithelzellen (Corneocyten, Hornzellen), die abgestorben

sind und in denen keine Zellorganellen mehr zu finden sind. Während der epidermalen Differenzierung migrieren die Zellen zur Oberfläche der Haut. Gehen die Zellen in die äußerste lebende Schicht der Epidermis, das Stratum granulosum über, extrudieren die „lamellar bodies“ ihren lipidreichen Inhalt in den Extrazellularraum. Aus dieser Lipidmatrix bilden sich ausgedehnte, das SC durchspannende lamellare Schichten, die sich nahezu parallel zu den Korneozytenoberflächen ausrichten (Abbildung 7).

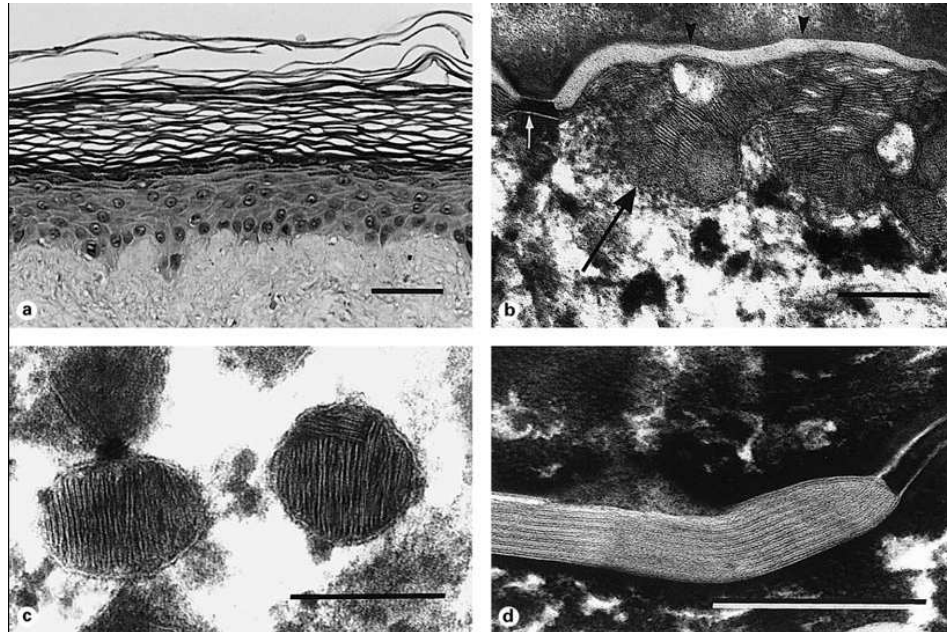


Abbildung 7: Histologische Abbildung der Epidermis

a. Lichtmikroskopische Abbildung der Gewebestruktur, Balken = 10 µm.

b. Elektronenmikroskopische Aufnahme der lamellaren Struktur an der Grenzfläche vom stratum granulosum/ corneum, lamellarer Strukturaufbau (großer Pfeil), Desmosomen (kleiner Pfeil) und mehrschichtige Struktur der Lipidlamellen (Pfeilspitzen), Balken = 0,25 nm

c. Lamellaraufbau, Balken = 0,25 nm

d. Ruthenium tetroxide-kontrastierte interzelluläre lamellare Doppelschicht. Darstellung von Korneozyten, Balken = 0,25 nm [Ponec et al., 2001]

2.3.2. Morphologie des Stratum corneum

Das Stratum corneum stellt die eigentliche Schutzschicht der Haut dar und ist zugleich wirksame Barriere gegen einen transepidermalen Wasserverlust sowie nahezu impermeabel für exogene Verbindungen.

Der Aufbau des Stratum corneum mit seinen abgeflachten toten Zellen, die von einem Lipidmantel umgeben sind (Abbildung 8), wird oft mit einem „Backstein-Mörtel Modell“ [Elias, 1983] verglichen, in dem die Korneozyten die Backsteine darstellen, die von einer kohärenten, lamellaren Lipiddoppelschicht, dem Mörtel umgeben sind [Moore and Rerck,

2000; Bouwstra et al., 2000; Forslind, 1994]. Innerhalb des Stratum corneum besteht ein Wassergradient. So nimmt die Wasserkonzentration von ca. 20 % nach außen hin auf 10 % ab.

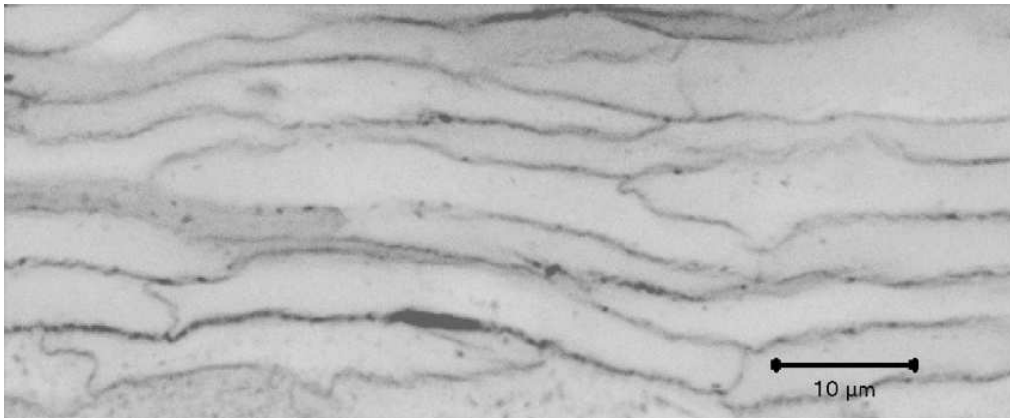


Abbildung 8: Mikroskopischer Querschnitt durch das humane Stratum corneum [aus Raudenkolb (2002), siehe Talreja et al. 2001]

Der interzelluläre Lipidmantel besteht aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolester, Fettsäuren und Cholesterolsulfat [Norlen, 2001].

Es gibt weitere Strukturmodelle des Stratum corneum, die abgeleitet von dem oben erwähnten Modell als sogenannte „mosaic model“ [Forslind, 1994], „sandwich model“ [Bouwstra et al., 2001a,b] und „single-gel-phase-model“ [Norlen, 2001] bezeichnet werden. Diese Modelle stimmen prinzipiell miteinander überein und stellen das Stratum corneum als flüssig-kristallinen Bereich dar, wobei das letzte Modell eher zur Platzierung der flüssigkristallinen Phase in den zentralen Bereich der Doppelschicht neigt [Silva et al., 2006]. Das neueste Modell, das „single-gel-phase-model“, postuliert eine Anordnung der Lipide in einem einphasigen, kohärenten lamellaren Gel. Außerdem existiert noch eine frühere Modellvorstellung einer gel-kristallinen Struktur des SC mit einer umgebenden flüssigen Lipidschicht [Friberg und Osborne, 1985a, b]. Welches dieser Modelle dem Stratum corneum tatsächlich entspricht, wird noch diskutiert.

Der Aufbau der Korneozyten unterscheidet sich wesentlich von allen restlichen Körperzellen, da im Laufe der Keratinisierung sämtliche Zellorganellen aufgelöst werden. Im Inneren befinden sich quervernetzte Keratinfibrillen, die in eine Matrix aus cystin- und prolinreichen Proteinen, die in den Keratohyalin granula gebildet wurden, eingelagert sind. Dieser Mikrofibrillen-Matrix-Verband trägt wesentlich zur mechanischen Stabilisierung der Hornschicht bei [Fiedler, 1989]. An die Stelle der sonst üblichen Plasmamembran tritt bei den Korneozyten eine sogenannte Horn-Hülle (cornified envelope) [Mutschler, 1986], eine 7-15 nm breite Barriere aus quervernetzten Keratinmakrofibrillen, an die Lipide kovalent gebunden sind. Die Korneozyten bestehen aus einer Ansammlung eng gepackter Keratinfilamente in einer amorphen Matrix aus Keratohyalin, die von einem verzweigten

Protein-Envelope umgeben ist. Während für Keratin eine α -Helix-Struktur angenommen wird, liegt das Envelope als β -Faltblatt vor [Odland, 1983]. An die Envelope-Proteine sind Ceramide kovalent gebunden [Lazo et al., 1995]. Diese Ceramide enthalten langkettige ω -Hydroxysäuren mit 30 bis 34 C-Atomen [Wertz and Swartzendruber, 1987]. Die Hydroxyceramide sind palisadenartig angeordnet und bilden eine Monoschicht [Wertz et al., 1989a, b], an die sich weitere interzelluläre Lipidschichten anschließen können.

Die Lipide bilden im Interzellularbereich des Stratum corneum lamellare Doppelschichten aus, die sich hinsichtlich ihrer Fluidität und Permeabilität von denen der Phospholipidbiomembranen unterscheiden. Die Abbildung 9 zeigt einen modellhaften Aufbau der Lamellarphase [Glombitza, 2001]. In der Lamellarphase ist durch unterschiedliche Kettenlängen ein Inenandergreifen der Ketten möglich, wodurch die Schichtdicke der Lipidphase verringert wird. Die Ordnung der Lamellphase ist durch die Bildung von lateralen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen der α -Hydroxyfettsäuren erhöht.

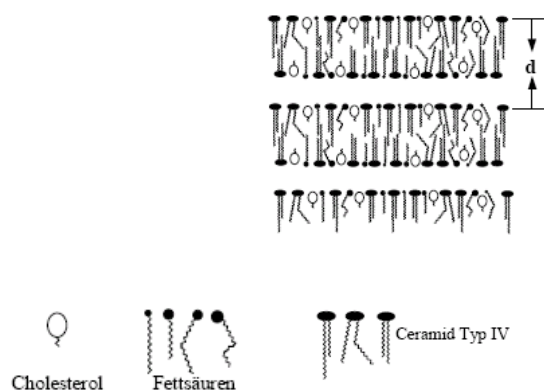


Abbildung 9: Modellhafte Darstellung des Aufbaus der Lamellarphase [Glombitza, 2001]

2.3.3. Lipidzusammensetzung des Stratum corneum

Die Bestandteile der hydrophoben Lipidschicht des Stratum corneum wurden in den Odland Bodies gebildet und im Laufe der Epidermisdifferenzierung über Exozytose an den Interzellularraum abgegeben [Odland, 1983]. Phospholipide, die die Hauptbestandteile menschlicher Zellmembranen darstellen, spielen mit wenigen Gewichtsprozenten am Gesamtanteil der Lipidmasse eine eher untergeordnete Rolle im Stratum corneum. Stattdessen finden sich vor allem die zu den Sphingolipiden zählenden Ceramide (35%), Cholesterol und Cholesterolsulfat (20-25 %), freie Fettsäuren (25 %) und Triglyceride (von 3 % bis 25 %). Häufig vorkommende Fettsäuren des Stratum corneum sind: Myristinsäure,

Palmitoleinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure, Linolsäure [Yardley und Summerly, 1981; Lampe et al., 1983, Wertz und Swartzendruber, 1987; Melnik et al., 1989; Elias, 1990; Hauck, 1994]. Heutzutage sind neun Typen von Ceramiden bekannt, die eine entscheidende Rolle in der Bildung der Lipidmatrixstruktur spielen [Bouwstra et al., 2001a, b; Jäger et al., 2004; Kiselev et al., 2005]. Die Zusammensetzung einiger Literaturdaten zur SC-Lipidzusammensetzung ist in der Tabelle 1 dargestellt. Die Analytik wurde mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung einiger SC Lipidkombinationen aus der Literatur. Alle Angaben als Gew.-% vom Gesamtlipid angegeben

Literatur	Cholesterol (CH)	CH-Sulfat	Trigly-Ceride	Ceramide	Fettsäuren	Sterol-Ester	Phospho-Lipide	Sonst.
Kooyman,1932	16,0	-	-	-	76,7	3,5	3,7	-
Yardley und Summerly,1981	19,6	0	2,6	49,2	26,0	0,7	0	1,9
Elias,1990	14,0	1,5	25,2	18,1	19,3	5,4	4,9	11,6
Swartzendruber et al.,1987	26,0	3,9	2,8	45,8	13,1	1,7	-	6,7
Melnik et al., 1989	28,9	1,8	3,5	35,0	19,2	6,5	3,2	1,9
Zellmer und Lasch, 1997	43,5	2,1	4,6	20,3	20,2	9,4	<1	-
Norlen et al., 1999	32,0	-	-	37	16	15	-	-
Glombitza, 2001	25	-	-	44 CerIV	31	-	-	-
Kiselev et al., 2005	25,0	5,0	-	55,0	15,0	-	-	-

2.3.4. Physikochemische Eigenschaften des Stratum corneum und der Stratum corneum-Lipide

Die Organisation des SC, vor allem der SC-Lipide, ist Forschungsthema verschiedener Forschungsgruppen. So konnten mittels Ruthenium tetroxide (RuO₄) interzelluläre lamellare

Doppelschichten von Korneozyten kontrastiert und im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden [Ponec et al., 2001]. Die Analyse der SC-Struktur kann mit Hilfe von Röntgenkleinwinkel- und -weitwinkeluntersuchungen sowie mit thermokalorimetrischen Untersuchungen (DSC) an exzidiertem humanen Stratum corneum durchgeführt werden.

Abbildung 10 zeigt ein Thermogramm für humanes Stratum corneum in einem Temperaturbereich von 0 bis 130 °C. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, sind im Stratum corneum, je nach Spender, Körperregion und Wassergehalt im SC, vier endotherme Übergänge zu differenzieren. Der erste Übergang zwischen 30 °C und 40 °C wird von Bouwstra et al. (1991a,b) auf eine Umwandlung der lateralen orthorhombischen Anordnung in eine hexagonale Packung zurückgeführt. Aufgrund der sehr geringen Übergangsenthalpie ist dieser Peak nicht immer detektierbar. Bei 70 °C (2) schmelzen die Lipide, wobei man entweder eine allgemeine Unordnung innerhalb der Lamellen oder eine Umwandlung der lateral hexagonalen Packung der Lipide in den flüssigen Zustand diskutiert. Die dritte Phasenübergangstemperatur bei 85 °C wurde als Denaturierung von Protein-Lipid-Komplexen vorgeschlagen und der vierte Phasenübergang zwischen 95 °C und 120 °C als Denaturierung von Proteinen innerhalb der Korneozyten, wobei dieser nur bei einem Wassergehalt des SC über 20 % zu finden ist [Golden et al., 1986; Bouwstra et al., 1991a]. Andere Autoren wie Silva (2005) sind der Meinung, dass ein Temperaturübergang bei ca 55 °C vermutlich zu einem Komplex von unpolaren Lipiden mit verknüpften Proteinen und ein Temperaturübergang bei 90 °C zu einem hohen Anteil an Lipidassoziaten gehören.

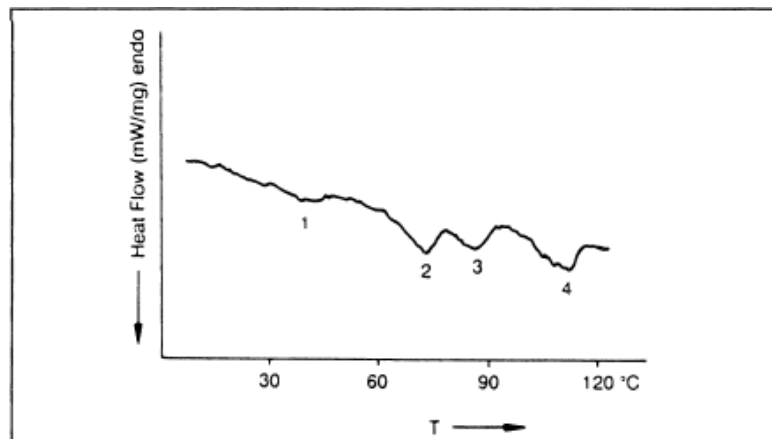


Abbildung 10: Thermogramm von exzidiertem humanen Stratum corneum [Bouwstra et al., 1991a]

Die hohen Schmelztemperaturen bei 72 und 85 °C werden als Lipidübergang aus dem flüssig-kristallinen in den isotropen Zustand interpretiert [van Duzee, 1975; Barry, 1987a]. Diese hohen Schmelztemperaturen charakterisieren einen hohen Ordnungsgrad der Lipide mit

einer hohen Dichte (Abbildung 11). Die Lipide bilden eine multiple Schicht, welche mit langkettigen Acylceramiden, die ausreichend lang für die Verknüpfung der Doppelschichten sind, stabilisiert wird.

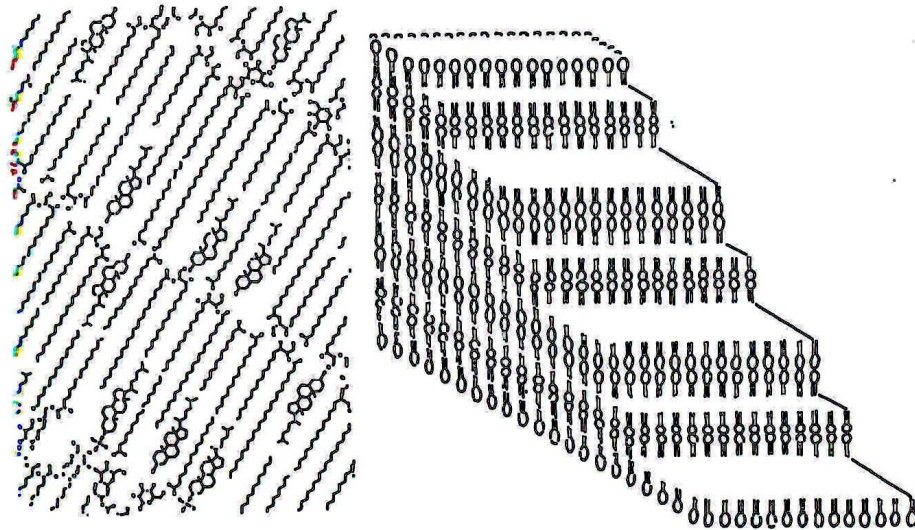


Abbildung 11: Schema der multilamellaren Struktur der Hornschichtlipide (Wertz (1986) und Landmann (1986) [Loth H., 1991])

Eine zunehmende Hydratation des Stratum corneum führt zu einer Verschiebung der ersten drei Peaks zu niedrigeren Temperaturen. Bei einem Wassergehalt im SC von über 20% wird der erste Peak von 43 °C auf 35 °C verschoben [van Duzee, 1975, Gay et al., 1994]. Dieser Effekt wurde auch für die anderen beiden Phasenübergänge festgestellt, bei denen es zu einer Verschiebung um 5-10 °C zu niedrigeren Temperaturen kam [Knutson et al., 1985, Gay et al., 1994]. Diese Veränderungen weisen auf eine Verflüssigung der Lipide durch das freie Wasser hin, wobei die hydrophoben Bereiche in einem weniger geordneten Zustand vorliegen würden. In Röntgenuntersuchungen konnte dieser „Wasser-Effekt“ jedoch nicht festgestellt werden, man konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen trockenem SC und hydratisiertem SC feststellen. Das könnte dadurch erklärt werden, dass das Wasser im Bereich der Kopfgruppen eingelagert wird und es gleichzeitig zu einer Verkürzung der Alkylketten kommt. Der Abstand zwischen den Alkylketten wird dadurch etwas vergrößert, aber die Netzebenenabstände werden insgesamt nicht verändert. Eine andere Erklärung wurde von Van Hal et al. (1996) auf der Basis von elektronenmikroskopischen Studien von Gefrierbrüchen von hydratisiertem SC vorgeschlagen. Sie nahmen an, dass das Wasser zum Einen von den Korneozyten absorbiert wird und zum Anderen als Bulkwasser im Stratum corneum vorliegen könnte.

Die Lipide im Stratum corneum haben laut der Röntgenkleinwinkel-Untersuchungen eine lamellare Anordnung. Friberg postulierte, dass die Lipide in Form von Flüssigkristallen vorliegen [Friberg, 1985a,b]. Der interlamellare Abstand in menschlichem Stratum corneum wird von verschiedenen Autoren zwischen 4,5 nm und 7 nm angegeben [Friberg, 1985a,b; Garson et al., 1991; Bouwstra et al., 1991a,b]. Bouwstra (1997) zeigt eine weitere, jeweils zwei Bilayer umfassende, detektierte „repeating unit“ mit einem Netzebenenabstand von etwa 13 nm. Diese Doppel-Periodizität wurde von Bouwstra et al. (2001b) auch als „Sandwich Model“ beschrieben und gilt als weiteres mögliches Modell des SC neben dem „Backstein-Mörtel-Modell“. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von anderen Forschungsgruppen haben das „sandwich Model“ bestätigt [Hill und Wertz, 2003; McIntosh, 2003]. Die Studie von Kiselev et al. (2005) mit Hilfe von Neutronendiffraktion hat vorgeschlagen, dass die SC-Membran eher eine trilamellare Wiederholung hat.

Röntgenweitwinkeluntersuchungen an SC zur Bestimmung der Nahordnung der Moleküle zeigten scharfe Interferenzen im Bereich zwischen 0,412-0,417 nm und 0,371-0,378 nm [Bouwstra et al., 1992; Bouwstra, 1997]. Das bedeutet, dass die Lipide im SC in kristalliner Form vorliegen, wobei deren Alkylketten in einer orthorhombischen senkrechten Anordnung ausgerichtet sind. Die Interferenz zwischen 0,412-0,417 nm weist gleichzeitig auf eine hexagonale Gel-Phase hin. Aufgrund der beiden Reflexe bei 0,41 nm und 0,37 nm liegt es nahe, die orthorhombische und hexagonale Phase voneinander zu differenzieren. Bei einigen Spendern kann man im Röntgendiffraktionsbild noch zusätzliche Interferenzen bei 0,96 nm und 0,46 nm sowie im Bereich zwischen 0,485-0,571 nm differenzieren. Diese Interferenzen werden auf die Anwesenheit von Keratin in den Korneozyten und von kristallinem Cholesterol, das in den Lamellen interkalierend eingelagert ist, zurückgeführt [Bouwstra et al., 1992].

Aufgrund bereits publizierter Ergebnisse, könnten orthorhombische und hexagonale Phase gleichzeitig vorliegen, da bei Hauttemperatur sowohl dichter gepackte trans- als auch beweglichere gauche-Konformere vorhanden sind [Wilkes et al., 1973; Bouwstra et al., 1992]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Ölsäure an der flüssigen Phase aus gauche-Konformeren beteiligt ist [Cornwell et al., 1994]. Downing et. al. (1993) folgerten aus ihren Untersuchungen, dass eine Entmischung der SC-Lipide stattfindet. Es wurde gezeigt, dass Triglyceride und Cholesterolester nur zu einem sehr geringen Teil in die Bilayer inkorporiert werden können. Diese Ergebnisse stützen das „Domänen-Mosaik-Modell“, ein weiteres vorgeschlagenes Modell für die SC-Struktur [Forslind, 1994]. Nach diesem Modell stellt man sich die Lipidmatrix des SC als ein diskontinuierliches System vor, indem kristalline Lipid-Domänen über flüssigkristalline Lipid-Phasen zusammengehalten werden, so dass ein Mosaik entsteht. Forslind (1994) postulierte, dass die kristallinen Domänen aus langkettigen

Lipiden bestehen, die sich in einem lamellaren Gelzustand befinden, während an den flüssigkristallinen Grenzbereichen kurzkettige Lipide, z.B. freie Fettsäuren mit weniger als 20 C-Atomen, beteiligt sind.

Laut Bouwstra et al. (2000) ist das SC durch eine hohe Ordnung der lamellaren Phase (1, 2, 3, 6, 7 Ordnung) mit einem sich wiederholenden Abstand von 12,8 nm charakterisiert. Eine frühe Interpretation, dass das SC eine hexagonale Packung besitzt, wurde verworfen. Laut neuen Forschungen fördern die freien Fettsäuren eine Umwandlung der hexagonalen Phase in eine orthorhombische laterale Packung [Bouwstra et al., 2001a].

2.3.5. Permeationswege für Arzneistoffe

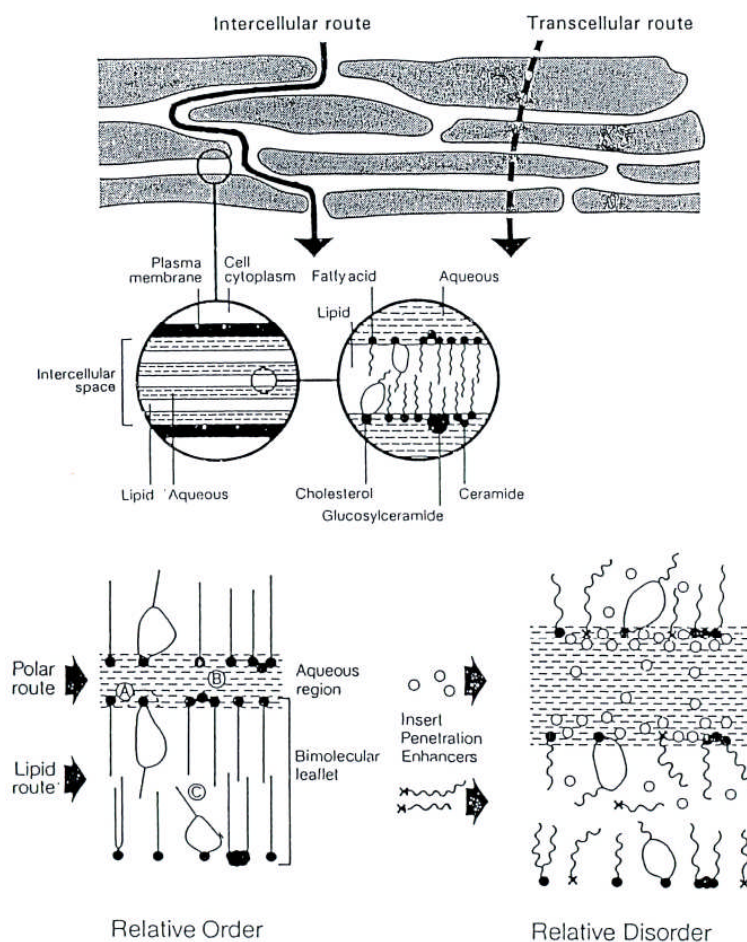


Abbildung 12: Transportwege durch das Stratum corneum [aus Barry, 1987b]

Man unterscheidet zwei Penetrationswege durch die Hautbarriere (Abbildung 12): den interzellulären Weg zwischen den Korneozyten und den transzellulären Weg quer durch die Korneozyten und Lipidschicht. Die interzellulären Lipide und zellulären Proteine können die Diffusion der Stoffe beeinflussen. Die relative Bedeutung der beiden Penetrationswege für Arzneistoffe ist von mehreren Faktoren abhängig, vom chemischen Potential, vom

Verteilungskoeffizienten zwischen benachbarten Phasen und vom Diffusionskoeffizient in den Protein- oder Lipidregionen [Barry, 1991]. Das heißt, in beiden Fällen muss die Substanz an geeigneter Stelle durch die interzelluläre Lipidmatrix diffundieren [Potts und Guy, 1992]. Die lipophilen Arzneistoffe permeieren eher interzellulär, der transzelluläre Weg ist für einige hydrophile Arzneistoffe beschrieben worden [Barry, 1987b]. Besonders lipophile Arzneistoffe können in unteren Schichten des SC eine Depot bilden, weil sie im hydrophilen Bereich eine geringere Löslichkeit besitzen [Wichers, 1989].

Im Unterschied zu undissoziierten Molekülen können dissoziierte Ionen durch wasserreiche Regionen diffundieren. Die Penetration durch wassergefüllte Poren wird für Aminosäuren und Peptide postuliert [Ruland et al., 1994]. Der Beitrag des Porenweges ist jedoch für einige lipophile Substanzen, wie z.B. Aciclovir oder Kortikosteroide ebenso wichtig. Wenn die Substanz nur durch den hydrophilen Weg permeiert, werden die Permeationsdaten nicht mehr mit der Lipophilie der Substanz, d.h. mit der Löslichkeit in der Lipid - Barriere korrelieren, sondern mit der Löslichkeit der Substanz im Wasser.

2.3.6. Absorption durch die Haut

Ob und in welchem Maße ein Wirkstoff, der in einer Zubereitung auf die Hautoberfläche aufgetragen wird, an der Oberfläche verbleibt, in die tieferen Hautschichten eindringt oder die Haut durchdringen kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab.

1. Beschaffenheit der Haut (Hautzustand, Hauttyp, Lokalisation, Behandlung der Haut)
2. Wirkung der Zubereitung auf die Haut

Effekte der Vehikel (Beeinflussung der Perspiration, Aufnahme oder Abgabe von Wasser, durch das Vehikel hervorgerufene Veränderungen des Hautzustandes, Einfluss des Vehikels auf die Löslichkeit des Wirkstoffes in den Hautschichten)

Effekte der Wirkstoffe (Keratolyse, Beeinflussung der Zellteilung, der Talgproduktion und der Durchblutung)

3. Eigenschaften der Zubereitungen und Wirkstoffe

Vehikeleigenschaften (Zusammensetzung des Vehikels, Benetzung der Haut durch das Vehikel, Eindringen des Vehikels oder seiner Bestandteile in die Haut, Veränderungen des Vehikels auf der Haut, Viskosität des Vehikels)

Wirkstoffeigenschaften (Konzentration, Löslichkeit im Vehikel, Lösungs-geschwindigkeit, Verteilung zwischen den Phasen des Vehikels, Partikelgröße des suspendierten Wirkstoffs, Koeffizient für die Verteilung zwischen Vehikel und Hornschicht, Löslichkeit im Hautfett, O/W-Verteilungskoeffizient, Bindung an Hautproteine) [Loth H., 1981].

Die Aufnahme von Wirkstoffen über die Haut ist ein komplexes Wechselspiel zwischen Arzneistoff, Vehikel und Haut. Der gesamte Prozess lässt sich in folgende Phasen unterteilen: Liberation (Freisetzung), Penetration (Eindringen in die Haut), Permeation (Verteilung in untere Epidermisschichten und in die Dermis). Bei einigen gut wasserlöslichen Substanzen verläuft die Freisetzung sehr schnell, jedoch kann eine gute Liberation nicht als Voraussetzung für eine gute Penetration dienen. Einige sehr lipophile Arzneistoffe bilden im Stratum corneum ein Depot, aus dem die Verteilung in die hydrophileren Schichten der Epidermis nur langsam erfolgt.

In vielen Fällen ist die Arzneistofffreisetzung aus Salben diffusionskontrolliert, d.h. die Diffusionsgeschwindigkeit der Arzneistoffmoleküle aus dem Salbenvolumen zur Grenzfläche Vehikel/Haut bestimmt die Kinetik.

Für die Lösungssalben gilt die Gleichung 1 [Higuchi, 1962]:

$$M = 2 \cdot A \cdot c_0 \cdot \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

M- freigesetzte Arzneistoffmenge (g), A- Fläche (cm²), c₀ - Anfangskonzentration (g/cm³), D - Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes im Vehikel (cm²/s), t- Zeit (s)

Für Suspensionssalben gilt die Gleichung 2:

$$M = A \cdot \sqrt{2c_0 \cdot c_s \cdot D \cdot t} \quad (\text{Gleichung 2})$$

M- freigesetzte Arzneistoffmenge (g), A- Fläche (cm²), c₀ - Anfangskonzentration (g/cm³), c_s - Sättigungskonzentration in der Salbe (g/cm³), D - Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes im Vehikel (cm²/s), t- Zeit (s)

Die Wirkstoffliberation aus Emulsionssalben ist sehr komplex, weil sie vom Emulsionstyp, dem Phasen-Volumen-Verhältnis und der Verteilung des Arzneistoffs zwischen der hydrophilen und lipophilen Phase abhängig ist [Loth, 1982].

Die Aufnahme durch die Haut, mit der Hornschicht als Haupthindernis ist ein passiver Transportprozess. Dabei spielt insbesondere die Grenzfläche zwischen Wirkstoffträger (Vehikel) und Hornschicht eine Rolle. Die Wirkstoffpermeation durch die Haut kann durch das Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben werden. Der Flux (J) als die pro Zeit- und Flächeneinheit transportierte Arzneistoffmenge ist folgendermaßen definiert:

$$J = \frac{D_m \cdot c_{sm}}{L} \cdot \frac{c_v}{c_{sv}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

J -Flux, D_m - Diffusionskoeffizient des Wirkstoffes in der Membran, c_{sm} - Wirkstofflöslichkeit in der Membran, L - Diffusionsweg durch die Membran, c_v -Konzentration des Wirkstoffs, gelöst im Vehikel, c_{sv} - Wirkstoffkonzentration im Vehikel.

Darüber hinaus gibt es drei Möglichkeiten für die Erhöhung der Wirkstoffpermeation: eine Erhöhung von D_m , c_{sm} und des Verhältnisses c_v / c_{sv} , d.h. die Erhöhung der Sättigungskonzentration des Wirkstoffes im Vehikel.

Die Tendenz eines Wirkstoffes, sein Vehikel zu verlassen, kann mit der thermodynamischen Aktivität ausgedrückt werden. Sie stellt das Verhältnis der Konzentration des Arzneistoffs (c_v) zu dessen Sättigungslöslichkeit (c_s) in der Grundlage dar (c_v/c_s). Mit steigender Arzneistoffkonzentration nimmt die thermodynamische Aktivität zu, bis sie beim Erreichen der Sättigung des Vehikels maximal wird. Daraus resultiert für die Lösungssalben mit steigender Applikationsdauer eine abnehmende thermodynamische Aktivität, während diese bei Suspensionssalben weitgehend konstant bleibt.

Bei Suspensionssalben bleibt die Arzneistoffpermeation ohne Einfluss auf die thermodynamische Aktivität, solange die Sättigungskonzentration konstant bleibt. Bei Lösungssalben steigen Liberation und Penetration mit wachsender Arzneistoffkonzentration; damit haben Lösungssalben besonders dann gute Liberationsmöglichkeiten, wenn die Arzneistoffkonzentration in der Nähe der Sättigungskonzentration liegt. Nach Lippold und Schneemann (1984) ist die Wahl des Vehikels bei Suspensionssalben solange ohne Einfluss auf die Penetration des Wirkstoffes, solange dieser in gesättigter Lösung vorliegt und zu einem bestimmten Teil für die Penetration verfügbar ist.

Bei Suspensionssalben ist eine ausreichende Liberation zu erwarten, wenn der Arzneistoff in der Grundlage hinreichend löslich ist, keine Assoziate mit ihr bildet und der pH Wert der wässrigen Phase die Ionisierung des Wirkstoffs zurückdrängt. Bei Lösungs- und Emulsionssalben ist eine sorgfältige Abstimmung zwischen Verteilungsverhalten des Wirkstoffs und den Lösungseigenschaften in der Grundlage bzw. in der den Arzneistoff lösenden Phase erforderlich, da immer die Gefahr besteht, dass der Wirkstoff zwar in der Salbe gelöst, aber nicht ausreichend von ihr freigegeben wird.

2.3.7. Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser

Bei pharmakokinetischen Prozessen spielt die Diffusion durch die Lipiddoppelschichten der Biomembranen (Lipiddiffusion) allgemein die dominierende Rolle. Lipidlösliche Substanzen werden dabei in der halbflüssigen Phosphatidschicht gelöst und können im transmembralen Raum wieder abgegeben werden. Der Transport vollzieht sich damit nach den physikalisch-chemischen Gesetzen der Verteilung und Diffusion. Aus dieser Beziehung wird deutlich, dass die Permeationsrate u.a. entscheidend vom Lipoid/Wasser- Verteilungskoeffizienten bestimmt wird. Andererseits muss die Substanz ein Mindestmaß an Wasserlöslichkeit besitzen, um sich hinreichend in den an die Lipidbarrieren angrenzenden wässrigen

biologischen Medien zu verteilen und verfügbare Permeationsflächen nutzen zu können. Der Lipid/Wasser- Verteilungskoeffizient (P) als Maß für die Fähigkeit eines Stoffes, Lipidmembranen zu durchdringen und sich in lipophilen Strukturen anzureichern, wird durch Verteilung zwischen einer wässrigen und einer lipophilen Phase (bevorzugt n-Oktanol) bestimmt und ergibt sich nach dem Nernst-Verteilungssatz (Gleichung 4):

$$P = \frac{C_o}{C_w} \quad (\text{Gleichung 4})$$

C_o Gleichgewichtskonzentration in der lipophilen Phase

C_w Gleichgewichtskonzentration in der wässrigen Phase

Für BM-17-V wurde ein Verteilungskoeffizient bei pH-7,4 und 20 °C von 547,6 ermittelt, der einer hohen Lipophilie entspricht.

2.3.8. Permeationsverbesserung durch Enhancer

Die Verbesserung der Permeation für dermal applizierte Substanzen kann durch Zusatz geeigneter Hilfsstoffe erreicht werden. Diese sollten fähig sein, den Transport durch die Hautbarriere zu erleichtern. Man unterscheidet unterschiedliche penetrationsfördernde Mechanismen:

Basierend auf dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz kann die passive Steigerung der Permeation durch eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten für den Wirkstoff, der Wirkstofflöslichkeit in der Membran und der Wirkstoffsättigungskonzentration im Vehikel erreicht werden [Moser et al., 2001]. Die erhöhte thermodynamische Aktivität des Wirkstoffes in der Formulierung hat eine Zunahme der Permeabilität zur Folge. Die Erhöhung des Verteilungskoeffizienten (Haut/Vehikel) bietet eine weitere Möglichkeit der Penetrationserhöhung [Hadgraft, 2001]. Ein Anstieg der Wirkstofflöslichkeit im Vehikel sowie in der Dermis kann durch die Zugabe von Propylenglycol (PG), Ethanol, Transcutol, N-methyl-pyrrolidon und unterschiedliche Esterprodukte erhalten werden [Yasdanian und Chen, 1995; Horne, 1999]. Diese Komponenten können ins Stratum corneum permeieren, lipophile Substanzen sowie andere Enhancer im gelösten Zustand mittransportieren und die Wirkstofflöslichkeit im lipophilen Bereich des Stratum corneum begünstigen. Horne (1999) konnte z.B. zeigen, dass die Liberation von Hydrocortison aus der Macrogol 300-Salbe durch den Zusatz von PG deutlich gesteigert wird. PG kann nicht nur die Wirkstofflöslichkeit im wässrigen Medium erhöhen, sondern auch die Dispergierung der Wirkstoffe in Hilfsstoffen wie Vaseline, Wollwachs und Eucerin verbessern und damit die Verarbeitung von

Kortikosteroiden und Antibiotika erleichtern. In niedrigen Konzentrationen ist Propylenglykol als gut hautverträglich eingestuft, in höherer Konzentration von ca. 30 % wurden unter Okklusionsbedingungen Hautunverträglichkeiten beobachtet [Rippe, 1973].

Eine weitere Möglichkeit der Penetrationserhöhung besteht in einer Interaktion von Hilfsstoffen mit polaren Gruppen der Lipide und einer Störung der Lipidpackung (Abbildung 13 und Abbildung 14). Die Penetrationsförderer schwächen die Cholesterol-Cholesterol und Cholesterol-Ceramid Wechselwirkungen, führen zur Denaturierung der interzellulären Proteine oder ermöglichen eine Extraktion von Lipiden aus dem Stratum corneum. Alle diese Mechanismen der Desorganisation der Lipidordnung des SC haben eine erleichterte Diffusion für hydrophile Substanzen zur Folge [Walker und Smith, 1996]. Für diesen Zweck wurden in die Zubereitungen Fettsäuren und deren Esterprodukte, Azone, Terpene eingearbeitet [Beastall et al., 1988; Bouwstra et al., 1989; Loth, 1989; Francouer et al., 1990; Yamane et al., 1995; Harrison et al., 1996a,b; El-Kattan et al., 2000; Jiang und Zhou, 2003; Nanayakkara et al., 2005].

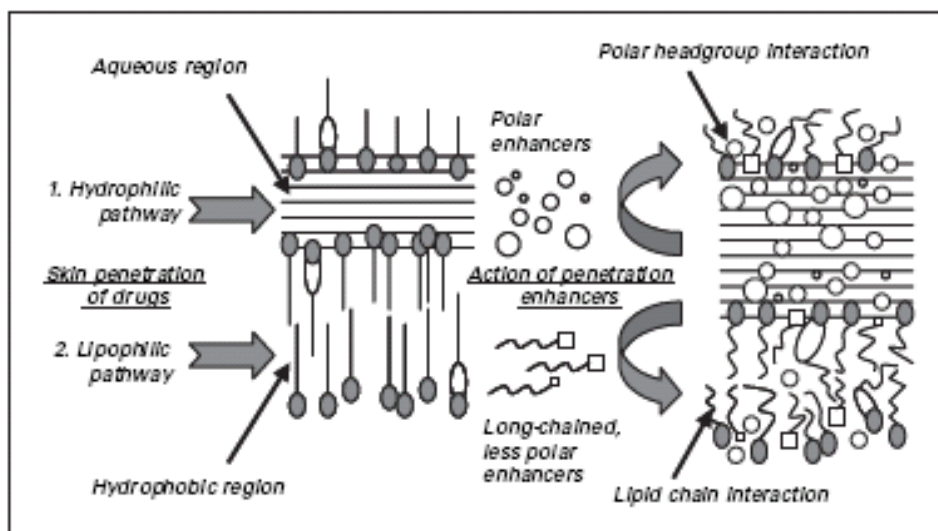


Abbildung 13: Hydrophiler und lipophiler Weg für die Permeation von Substanzen und Wirkmechanismus der Penetrationsförderung [aus Trommer und Neubert, 2006]

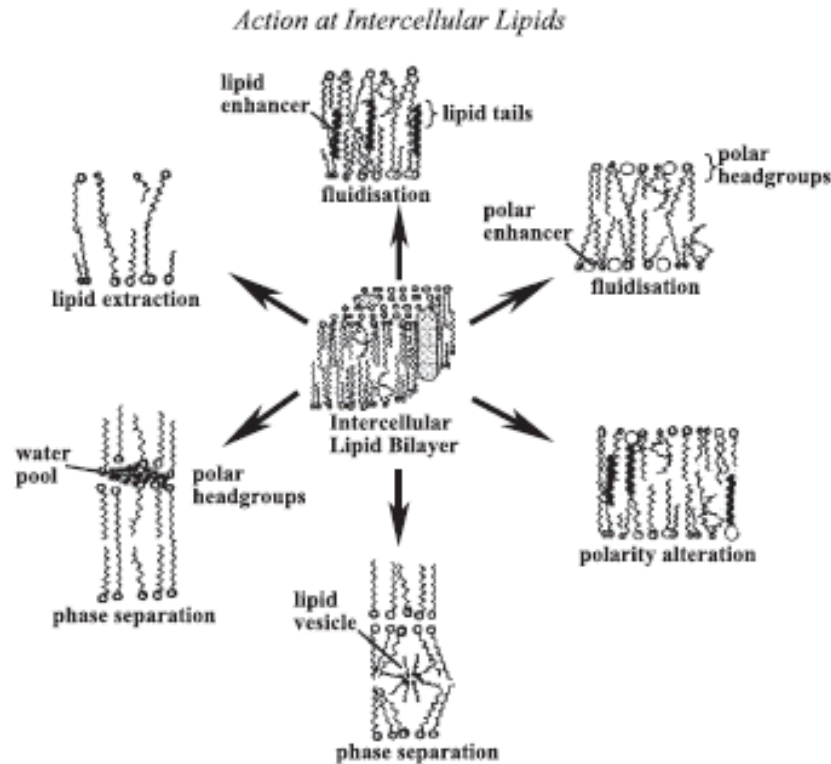


Abbildung 14: Interaktion der Penetrationsförderer innerhalb der Lipiddomäne [aus Williams und Barry, 2004]

Die Feuchthaltemittel wie z.B. Harnstoff können die Hydratation des Stratum corneum erhöhen und damit die Diffusion von hydrophilen Substanzen verbessern [Trommer und Neubert, 2006].

Die bei Okklusion nachgewiesene Permeationsverbesserung beruht auf dem stark erhöhten Wassergehalt des SC. Es wurde gezeigt, dass 40-60 % (w/w) Wasser im SC zu einer Störung der Lipidlamellen durch das Aufweiten der Lipidkopfgruppen von Cholesterinsulfat und Carboxysäure führt, dadurch kann die Diffusion für polare Substanzen verstärkt werden [Williams und Barry, 2004]. Durch das Aufweiten der Domäne wird auch der lipophile Weg gestört, was einen erleichternden Transport für die lipophilen Substanzen zur Folge hat.

Die Störung der Lipiddoppelschicht kann nämlich auch durch ein Angreifen von polaren Enhancern auf die hydrophoben Lipidbereiche des SC erfolgen, was zur Penetrationsverbesserung für lipophile Substanzen führt [Kalbitz et al., 1996]. Das Wasser im SC führt auch zur Verringerung der Wechselwirkungen der Arzneistoffe mit Strukturen, die Wasserstoffbrücken ausbilden können.

Eine andere Möglichkeit der Penetrationssteigerung besteht in einer Interaktion lipophiler Penetrationsförderer mit den Kohlenwasserstoffketten innerhalb der Lipiddoppelschicht [Hirvonen et al., 1994]. Durch die Änderung der Lipidpackung und durch die Erhöhung der

Fluidisierung der Kohlenwasserstoffketten wird die Permeation von lipophilen Substanzen erleichtert. Zusätzlich kann die Porosität des Stratum corneum durch die Anwendung von chemischen Substanzen, die einige Lipide und Proteine aus der Struktur extrahieren, gesteigert werden.

Alkohole

Ethanol, als häufig angewendetes Cosolvens und Penetrationsförderer, kann die Wirkstofflöslichkeit im Vehikel und auch im Lipidbereich des SC erhöhen. Alberg (1998) hatte eine leicht steigende Permeation für Hydrocortison bei steigendem Ethanolgehalt bis 10 % (w/w) in der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe beobachtet. Der bivalente Alkohol, Diethylenglykol (Transcutol®) erhöhte die Permeation von einigen Substanzen [Yazdanian und Chen, 1995], in Kombination mit Azonen [Harrison et al., 1996a,b] und Propylenglykol [Gungor und Bergisadi, 2004] wurde für ihn ein potenzierender Permeationseffekt publiziert. Die verbesserte Permeation von lipophilen Substanzen bei Anwesenheit von alkoholhaltigen Enhancern kann aufgrund einer verbesserten Wirkstofflöslichkeit im lipophilen Bereich des SC erfolgen. Außerdem kann Ethanol als gutes Lösungsmittel einige Lipide und Proteine aus dem SC extrahieren und damit dessen Porosität erhöhen. Dabei nimmt die Fähigkeit zur Extraktion von Lipiden und Proteinen mit steigender Alkoholkonzentration sowie innerhalb der Reihe der Alkohole mit wachsender Kettenlänge zu. Jedoch können die Alkohole mit einer hohen Kohlenwasserstoffatom-Zahl einen Abfall der Permeation hervorrufen. Chien et al. (1988) haben das bei einem Experiment mit Indometazin gezeigt. Ein Anstieg des Ethanolgehalts über 70 % führt nämlich zu einer Dehydratisierung des SC und ist mit einer Fluxabnahme verbunden. Alberg (1998) konnte keine Fluxzunahme bei der Permeation von HC aus WHS mit Ethanolgehalten von 10 % bis 30 % nachweisen.

Azone

Sehr lipophile Substanzen wie z.B. 1-Dodecylazacycloheptan-2-on (Azone) oder Terpene können mit hydrophilen Kopfgruppen interagieren oder sich seitlich an den Ketten der Lipide interkalierend einlagern und somit deren Fluidität erhöhen [Beastall et al., 1988; Bouwstra et al., 1989; Yamane et al., 1995; Harrison et al., 1996a,b]. Außerdem können sich Azone, deren hydrophobe Seitenkette in der Dimension dem Cholesterolskelett entspricht, zwischen den Alkylketten der Lipiddoppelschicht einlagern und damit die Wechselwirkungen zwischen den Ceramiden und dem Cholesterol vermindern. Die Verflüssigung der Interzellularlipide hat eine Permeationszunahme zur Folge [Hadgraft, 2001]

DMSO

DMSO wird häufig als Penetrationsförderer eingesetzt. Wegen Hautirritationen ist die Anwendung von DMSO in großen Mengen problematisch [Iliev et al., 1997], deswegen werden Konzentration bis 10 % eingesetzt.

Für die penetrationsfördernden Eigenschaften des Hilfsstoffes wurden unterschiedliche Mechanismen beschrieben. DMSO kann selbst ins SC permeieren da es aufgrund seiner S-O-polaren Bindung ein starkes Lösungsmittel mit einer hohen Dielektrizitätskonstante darstellt. Weiterhin erhöht sich in mit DMSO angereicherten Regionen die Löslichkeit für die permeierenden Substanzen. Bei hoher DMSO-Konzentration (ca. 60 %) wird die Lipidorganisation im SC durch Denaturierung der interzellulären Proteine gestört [Trommer und Neubert, 2006]. Bei diesem Vorgang findet eine Umwandlung des Keratins aus der α -Helix Form in die β -Form statt [Williams und Barry, 2004].

Triglyceride

Loth (1989) wies nach, dass flüssige Substanzen wie das Triglycerid Softisan in den interzellulären Raum des SC penetrieren können, da Softisan einen guten Benetzungseffekt hat. Flüssige Triglyceride, welche eine geringere Polarität besitzen, verursachen durch die Interkalierung in das SC die Desorganisation der multilamellaren Schicht des SC und stören damit seine Struktur.

Fettsäuren

Die penetrationsfördernde Eigenschaften der Fettsäuren wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben. Die Fettsäureaktivität ist direkt von der Struktur der Moleküle abhängig. Generell sind die ungesättigten Fettsäure effektiver als gesättigte. Je mehr Doppelbindungen die ungesättigte Säure im Molekül enthält, desto effektiver ist sie. Weiterhin sind cis-Fettsäuren aktiver als die Fettsäuren mit trans-Konfiguration [Golden et al., 1986]. Die cis-Modifikation hat ein größeres Potential zur Störung der Lipidpackung in der Doppelschicht des SC. Die Ölsäure, als häufiger Vertreter dieser Enhancergruppe, kann die Mikrostruktur des SC verändern und damit eine Erhöhung der Permeation zur Folge haben [Francoeur et al., 1990]. Sie kann Hohlräume im SC bilden und damit zu einer Störung der Lipiddoppelschicht führen [Jiang und Zhou, 2003]. Die permeationsfördernden Eigenschaften wurden auch für die Palmitoleinsäure und Linolsäure in der Literatur bereits beschrieben [Nanayakkara et al., 2005]. Für die genannten Fettsäuren wurde der Anstieg der Permeation für Butylparabene registriert, wobei die Palmitoleinsäure die höchste Aktivität zeigte. Als Erklärung für die erhöhte Permeabilität wurde ein synergistischer Effekt zwischen

der Fettsäure und Butylparaben, bestehend in einer Interaktion zwischen den polaren und unpolaren Lipidresten, angenommen.

Nerzöl (mink oil, huile de vision)

Nerzöl ist ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der Triglyceride mit ungesättigten Fettsäuren. Es wird ausschließlich aus dem dorsalen subcutanen Fettgewebe des Nerz gewonnen [Fiedler, 1996]. Für die Herstellung von Kosmetika wird eine Spezialfraktion (cosmetic grade „multirefined“ light Mink oil) angeboten. Der Hilfsstoff wird zur Zeit in der kosmetischen Haarpflege und als Haarbehandlungsmittel eingesetzt, in Russland wird die Nerzölemulsion als Kosmetikum und Arzneimittelgrundlage für die Herstellung von Rezepturen in der Apotheke verwendet. Die Zusammensetzung der Fettsäuren (%) ist: Myristinsäure 3,5; Myristoleinsäure 0,6; Palmitinsäure 16,9; Palmitoleinsäure 17,0; Stearinsäure 2,0; Ölsäure 45,3; Linolsäure 14,7. Der unverseifbare Anteil besteht aus Cholesterin und β - und δ -Tocopherol. Dank seines reichen Gehalts an ungesättigten Fettsäuren (beträgt insgesamt 75 %) und des UV-Schutzes, welcher wesentlich höher als bei den physikalischen Faktoren ist, wurde der Hilfsstoff für dermale Zubereitungen in Russland eingesetzt. Außerdem lässt sich das Öl aufgrund einer hohen Polarität (HLB-Wert 9,0) gut mit Wasser emulgieren [Fiedler, 1996]. Der Verteilungskoeffizient ist um das dreifache höher als der anderer fette Öle. Darüber hinaus ist Nerzöl trotz des hohen Grads an ungesättigten Strukturen (VZ/NaOH = 0,140) über zehn Jahre stabil. Nerzöl wurde als besonders gutes Hautpflegemittel eingestuft, weil es 75 % ungesättigte Fettsäuren im Triglycerid enthält und weil es die Haut fühlbar geschmeidig macht.

Ester

Die Fettsäureester, wie z.B. Isopropyl-n-Butyrat, Isopropyl-n-decanat, Isopropyl-myristat und Isopropylpalmitat werden zur Zeit sehr häufig als Penetrationförderer angewendet.

Der Ester Isopropylmyristat kann die Packung der Lipide im SC stören und interkalierend in der Lipiddoppelschicht als getrennte Phase vorliegen [Potts et al., 1991; Ongpipattanakul et al., 1991]. Anhand von DSC-Untersuchungen konnten von Leopold und Lippold Wechselwirkungen mit Lipiden im SC nachgewiesen werden [Leopold und Lippold, 1995a]. Isopropylmyristat konnte je nach Wirkstoff einen positiven Einfluss auf die Permeation und auch negativen Einfluss auswirken. Shu und Jun (1996) haben eine Steigerung für die Naproxenpermeation festgestellt, Refai (2001) und Brinkmann (2003) haben allerdings eine Reduzierung der Permeation für Hydrokortison registriert.

Alle genannten Enhancer können in Kombinationen z.T. synergistisch wirken [Kobayashi et al., 1997; Arellano et al., 1999; Cha et al., 2001; Brinkmann und Müller-Goymann, 2003; Jiang

et al., 2004; Jiang und Wang, 2004; Gungor und Bergisadi, 2004; Panchagnula et al., 2005; Narasimha et al., 2006]. Kombinierte Enhancer scheinen effektiver zu sein als die Einzelsubstanzen, sie können aber auch im Vergleich zu den einzelnen Hilfsstoffen zu einer Reduzierung der Permeabilität führen [Blume, 1996; Alberg und Müller-Goymann, 1999]. Von der potenzierenden Wirkung wird erst in den letzten Jahren berichtet. Frühere Arbeiten beschrieben die permeationsfördernden Eigenschaften für die einzelnen Substanzen [Wotton et al., 1985; Kurihara-Bergstrom et al., 1990; Rojas et al., 1991; Shu und Jun, 1996; Bach und Lippold, 1998]. Als eine mögliche Erklärung für den Synergismus wurde ein kombinierter Effekt von hydrophilen und lipophilen Enhancern auf die Struktur der SC-Lipide vorgeschlagen. Dieser Effekt besteht aus einer Desorganisation der Lipidstruktur des Stratum corneum und umfasst außerdem eine Proteindenaturierung [Goffin et al., 2000].

2.3.9. Metabolisierung von Arzneistoffen in der Haut

Die Haut stellt eine wichtige Barriere für das Eindringen von körperfremden Substanzen (Toxine, chemischen Substanzen) in den Organismus dar: eine physikalische (Diffusions-Barriere) und biochemische (enzymatische) Barriere. Die enzymatische Biotransformation ist eine wichtige Funktion für die Homeostase der Haut [Redoules et al., 1998]. Das Hautorgan ist für den extrahepatischen Metabolismus verantwortlich, wobei seine Enzyme ein hohes Potential für die Biotransformation von chemischen Toxinen und krebserregenden Substanzen aus der Umwelt haben. Die wichtigsten Hautenzyme sind Esterasen [Maruyama und Suzuki, 1982], Reduktasen [Takayasu, 1983], Dehydrogenasen [Hsia und Hao, 1966] Oxidasen [Greaves, 1971], Decarboxylasen [Lesiewicz et al., 1980]. Diese Enzyme sichern die Flexibilität und die Beständigkeit der biochemischen Barriere der Haut. Zu den Phase-I-Reaktionen, die in der Haut festgestellt worden sind, gehören insbesondere Oxidations-, Hydroxylierungs-, Reduktions- und Hydrolysereaktionen. Hierfür seien folgende Beispiele genannt:

Oxidation: 11-Hydroxy-corticosteroid—11-Keto-corticosteroid (Hydrocortison—Cortison), Oestradiol—Oestron, Testosteron—4-Androsten-3,17-dion [Loth, 1987].

Die enzymatische Hydrolyse findet in unterschiedlichen subzellularen Bereichen statt [Hikima et al., 2001, Hikima und Maibach, 2001]. Durch die Hautbiotransformation wird nicht nur die toxische sondern auch therapeutische Wirkung der Substanzen bei perkutaner Absorption reduziert. Das Substanzprofil ändert sich in der Haut. Bei der topischen Applikation der hoch effektiven Substanzen (wie z.B. Steroide, Peptide und Proteine) kann die therapeutische Wirkung nach der Metabolisierung wesentlich reduziert werden [Ranade, 1991].

2.4. Die Hautäquivalente und ihre Anwendung

Als Alternative zum Stratum corneum wurden organotypische Hautäquivalente, kurz ASC (artificial skin constructs) eingesetzt. Die Kulturmodelle ziehen in den letzten Jahren großes Interesse besonders für den pharmazeutischen Bereich bei der Untersuchung von Permeationen und Metabolisierung auf sich. Der Vorteil der Konstrukte gegenüber dem SC besteht darin, dass ihre Kultivierung standardisiert werden kann und dass sie von Faktoren wie Geschlecht, Alter und Körperregion unabhängig sind. Die Barriereigenschaften der ASC sind im Vergleich zu humanen Stratum corneum nicht so stark ausgeprägt, was eine Untersuchung der Permeation hydrophiler Substanzen erleichtert. Die erhöhte Permeabilität ist abhängig von dem eingesetzten Arzneistoff. Obwohl die Kulturen eine höhere Permeabilität als Stratum corneum-Exzidate zeigen, ist die Reihenfolge der Permeation häufig identisch. In der Literatur wurden die Permeationskoeffizienten von ASC und SC für mehrere Substanzen in verschiedenen Zubereitungen verglichen und dieser Unterschiedsfaktor im Permeationskoeffizienten wurde für die unterschiedlichen Wirkstoffe angegeben [Kriwet und Parenteau, 1996; Schmook et al., 2001; Specht et al., 1998; Hoffmann und Müller-Goymann, 2005; Winkler und Müller-Goymann, 2005]. Außerdem ist in einigen Arbeiten beschrieben worden, dass bei der Permeation durch humanes Stratum corneum und durch Hautkonstrukt die gleiche Gesetzmäßigkeit in der Permeationsreihenfolge nachvollgezogen werden konnte [Specht et al., 1998]. So konnten Ernesti et al. (1992) für Estradiol, Hydrokortison und Testosteron um den Faktor 63, 187, und 35 erhöhte Permeabilitäten bestimmen. Bei Winkler und Müller-Goymann (2005) lag der Unterschied der Permeationskoeffizienten für ALA-HCl (5-Aminolävulinsäure) in der lipophilen Grundlage bei Faktor 64, für ABE (ALA-n-butylester) bei Faktor 142, für die gleichen Wirkstoffe nur aus hydrophilen Grundlagen lag der Unterschied bei Faktor 860-2800. Bei Specht et al. (1998) lag der Unterschied der Permeationskoeffizienten für Ibuprofen bei Faktor 20, für Hydrocortisonacetat in der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe (WHS) bei Faktor 17.

Anderen Studien zeigten jedoch auch, dass rekonstruierte Hautmodelle nicht generell als Alternative für das Stratum corneum geeignet sind [Schmook et al., 2001].

Ernesti et al. (1992) konnten zeigen, dass 50 % topisch appliziertes Testosteron nach Durchtritt durch das Hautäquivalent metabolisiert wurde, wobei das Metabolitenspektrum dem von exzidierte humaner Vollhaut entsprach. Der Metabolismus ist von physikochemischen Eigenschaften, metabolischen Ressourcen der Haut zur Bindung von Substanzen abhängig. Hautäquivalente wurden auch für Metabolisierungsuntersuchungen als Ersatz zur Haut vorgeschlagen. *In vitro* Studien mit der Haut oder mit Hautäquivalenten

können zeigen, wie die Biotransformation der topisch applizierten Substanzen in der Haut nach der Penetration erfolgen kann [Kao et al., 1985]. Hautäquivalente wurden für diesen Zweck als nützlicher Ersatz der Haut [Slivka, 1992; Slivka et al., 1993] vorgeschlagen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Arzneistoffe

Betamethason-17-valerat (BM-17-V), Betamethason (BM), Prednisolon stammten von der Firma Synopharm (D-Barsbüttel) ebenso Hydrocortison, mikronisiert, nach Ph.Eur.97 (Synopharm GmbH, D-Barsbüttel). Prednicarbat, Chargennr. H027.01 (SS) wurde von Aventis (D-Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt.

Strukturformeln und weitere Informationen finden sich im Allgemeinen Teil.

3.1.2. Hilfsstoffe zur Herstellung halbfester Zubereitungen

Für die Herstellung der hier untersuchten Formulierungen, wurden die nachfolgenden Substanzen verwendet. Alle Substanzen waren vom Hersteller laut DAB 10 geprüft worden und entsprachen den Anforderungen, was durch Prüfprotokolle belegt war.

Emulgierender Cetylstearylalkohol DAB (Lanette N) (Henkel, D-Düsseldorf). Lanette N enthält 10 % (m/m) Natriumcetylstearylalkoholsulfat und 90 % Cetylstearylalkohol; dickflüssiges Paraffin DAB 10 (Mainland, D-Frankfurt), weißes Vaseline DAB 10 (Hansen & Rosenthal, D-Hamburg), Wollwachsalkohol (Caelo, D-Hilden), Glycerolmonostearat 60 DAC 2000 (Caelo, D-Hilden), Cetylalkohol (Caelo, D-Hilden), Mittelkettige Triglyceride (Miglyol®) (Caelo, D-Hilden), Propylenglykol (Caelo, D-Hilden), Macrogol-20-glycerolmonostearat (Tagat S, Caelo, D-Hilden), Cetylstearylalkohol (Henkel, D-Düsseldorf)

Isopropylmyristat (IPM) wurde von Unichema (D-Emmerich), Isopropanol (IPA) wurde von Chemie Vertrieb Hannover (D-Hannover) bezogen

Mink Oil, Nerzöl (Caelo, D-Hilden)

Zusammensetzung: Myristinsäure 3,5 %, Myristoleinsäure 0,6 %, Palmitinsäure 16,9 %, Palmitoleinsäure 17,0 %, Stearinsäure 2,0 %, Ölsäure 45,3 %, Linolsäure 14,7 %

Wasser

Für die Herstellung aller Lösungen wurde Wasser in Arzneibuch-Qualität „gereinigtes Wasser“ verwendet.

3.1.3. Sonstige Stoffe

HPLC Fließmittel

Es wurde Acetonitril, absolut oder Acetonitril, pro HPLC-analyse, eingesetzt und bezogen von Acros Organics (Bel-Geel).

Extraktionsmittel

Es wurde Methanol, absolut oder pro HPLC-analyse, eingesetzt und bezogen von Fisher Chemicals UK Limited, Bishop Meadow Road, Loughborough (UK-Leicester).

Puffer

Für die Pufferherstellung pH 7,4 wurden PBS Tablets von der Firma (ICN Biomedicals Inc., D-Eschwege) verwendet.

Für die Untersuchungen der Stabilität von BM-17-V wurden Phosphatpufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte Ph.Eur.2002 hergestellt. Für die Herstellung wurden Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, D-Darmstadt) und Natriummonohydrogenphosphat (Merck, D-Darmstadt) benutzt.

3.1.4. Verwendete Fertigarzneimittel

Die Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen der BM-17-V-haltigen Formulierungen wurden mit denen kommerzieller Produkte verglichen. Für die Untersuchungen wurden folgende Fertigarzneimittel ausgewählt:

a) Betamethason-17-valerat Präparate

Celestan-V® Salbe 0,1%

1,0 g Salbe enthält 1,22 mg BM-17-V, weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin (Essex Pharma GmbH, D-München)

Celestan-V® Creme 0,1%

1,0 g Creme enthält 1,22 mg BM-17-V, weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Cholesterol, Phosphatpuffer, Wasser (Essex Pharma GmbH, D-München)

Soderm® Salbe 0,1%

1,0 g Salbe enthält 1,22 mg BM-17-V, weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Wollwachs (Dermapharm AG, D-Grünwald)

Alle Zubereitungen werden zur Behandlung von entzündlichen, allergischen oder juckenden Hauterkrankungen, bei denen die symptomatische Anwendung von stark wirksamen Kortikosteroiden angezeigt ist, angewendet.

b) Hydrocortison-Präparate**Dermallerg-ratiopharm Creme 1%:**

1,0 g Creme enthält 10 mg Hydrocortison, Kaliumsorbat E 202, selbstemulgierende Tri- und Partialglyceride, selbstemulgierende Salbengrundlage O/W, Cetylalkohol, weißes Vaseline, Glycerol, Citronensäure E 330, Natriumcitrat E331, Butylhydroxytoluol E 321, Palmitoylascorbinsäure, gereinigtes Wasser (ratiopharm GmbH, D-Ulm-Donautal)

Hydroderm HC 0,5 % Creme:

1,0 g Creme enthält 5 mg Hydrocortison, dünnflüssiges Paraffin, Cetylstearylalkohol, weißes Vaseline, Cetomacrogol 1000, emulgierendes Wachs, Propylenglykol, Phenoxyethanol, Kaliumsorbat, Sorbinsäure, Natriumedetat, gereinigtes Wasser (Hans Karrer GmbH, D-Königsbrunn)

c) Hydrocortison-21-acetat Präparate**Soventol® Creme**

1,0 g Creme enthält Hydrocortison-21-acetat 2,5 mg, Ammoniaklösung, Carbomer, Edetinsäure = Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz, flüssiges Wachs, Wasser, Isopropylmyristat, Macrogol 400, Paraffin Öl, 2-Propanol

3.1.5. Verwendete kommerzielle Grundlagen

Dermatop Basiscreme (Aventis, D-Frankfurt am Main). Auf dem Markt ist diese Grundlage mit dem Wirkstoff Prednicarbat. Wirkstofffreie Formulierung. Folgende Bestandteile sind deklariert: Benzylalkohol, Edetinsäure, Fettalkohole (1-Oktadecanol=Stearylalkohol, 1-Hexadecanol = Cetylalkohol, 1-Tetradecanol = Myristylalkohol), 2-Oktyldodecanol, dünnflüssiges Paraffin, Polysorbat 60, Sorbitanstearat, gereinigtes Wasser

Müstella (Russland)

Nerzöl, Glycerol, flüssiges Wachs, Ethanol, Citral, Nipagin, Nipasol, Wasser

3.2. Methoden**3.2.1. Herstellung der verwendeten halbfesten Zubereitungen**

Alle Formulierungen wurden manuell hergestellt.

3.2.1.1. Die Rezepturen DAB**Wollwachsalkoholsalbe DAB 1996 Lanae alcoholum unguentum (WS)**

Cetylstearylalkohol 0,5 Teile

Wollwachsalkohol 6,0 Teile

Weisses Vaseline 93,5 Teile

Die Substanzen wurden auf dem Wasserbad bei 60°C geschmolzen. Die Salbe wurde bis zum Erkalten gerührt.

Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (WWS)

WS 1 Teil

Wasser 1 Teil

In die auf etwa 60°C erwärmte Wollwachsalkoholsalbe wurde auf die gleiche Temperatur abgekühltes zuvor frisch aufgekochtes Wasser eingearbeitet. Die Salbe wurde bis zum Erkalten gerührt und das verdampfte Wasser ergänzt.

Hydrophile Salbe (HS)

Emulgierender Cetylstearylalkohol 30,0 Teile

Dickflüssiges Paraffin 35,0 Teile

Weisses Vaseline 35,0 Teile

Die Substanzen wurden auf dem Wasserbad bei 60°C geschmolzen. Die Salbe wurde bis zum Erkalten gerührt.

Wasserhaltige Hydrophile Salbe (WHS)

HS 30,0 Teile

Wasser 70,0 Teile

In die auf etwa 60°C erwärmte HS wurde auf die gleiche Temperatur abgekühltes zuvor frisch aufgekochtes Wasser eingearbeitet. Die Salbe wurde bis zum Erkalten gerührt und das verdampfte Wasser ergänzt.

Nichtionische Hydrophile Creme

Cetylstearylalkohol 10,0 Teile

Weißes Vaseline 25,0 Teile

Polysorbat 5,0 Teile

Glycerol 10,0 Teile

Wasser 50,0 Teile

In das auf dem Wasserbad auf etwa 70°C erwärmte Gemisch von Cetylstearylalkohol und weißem Vaseline wurde auf die gleiche Temperatur erwärmte Mischung der übrigen Bestandteile in Anteilen eingearbeitet, danach wurde frisch aufgekochtes gereinigtes Wasser eingearbeitet. Die Creme wurde bis zum Erkalten gerührt und das verdampfte Wasser ergänzt.

Basis Creme DAC

Glycerolmonostearat 60 4,0 Teile

Cetylalkohol 6,0

Mittelkettige Triglyceride Miglyol® 7,5

Weisses Vaseline 25,5

Tagat S (Macrogol-20-glycerol-monostearat) 7,0

Propylenglykol 10,0

Wasser 40,0

Die Zubereitung wurde gemäß Deutschem Arzneimittelcodex (DAC 2002) hergestellt.

Glycerolmonostearat 60, Cetylalkohol, Neutralöl, weißes Vaseline wurden im Wasserbad auf etwa 60°C erhitzt und anteilweise mit der auf die gleiche Temperatur erwärmten Mischung von Macrogol-20-glycerol, Propylenglykol und Wasser versetzt. Die Creme wurde bis zum Erkalten gerührt und das verdampfte Wasser ersetzt.

3.2.1.2. „Nachbau“ von Müstella

Weiterhin wurden Zubereitungen hergestellt, die sich in ihrer Zusammensetzung an dem Fertigkosmetikum Müstella Creme orientieren. Alle Formulierungen enthielten Nerzöl, Glycerol, Ethanol und Wasser. Nerzöl hat selbst zwar gute Emulgiereigenschaften, dennoch wurden in die Rezeptur unterschiedliche Emulgatoren wie Lanette N, Cetiol-V eingearbeitet.

Die quantitativen Rezepturzusammensetzungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Diese Zubereitungen werden im Folgenden als Variationen 1-5 bezeichnet. In den auf dem Wasserbad auf etwa 70 °C erwärmten Cetylstearylalkohol wurde die auf gleiche Temperatur erwärmte Mischung der übrigen Bestandteile in Anteilen eingearbeitet, danach wurde frisch aufgekochtes gereinigtes Wasser eingearbeitet. Das Wasser wurde vorher mit Parabenen konserviert. Die Creme wurde mit Hilfe eines Unguators-Konietzko hergestellt. Der Anteil der Wasserphase entsprach in jeder Rezeptur 85 % (w/w). Da die Rezepturen 2 und 3 nicht emulgierbar waren und die Fließgrenze der Rezeptur 1 zu hoch war, wurden für spätere Versuche die Variationen 4 und 5 ausgewählt.

Tabelle 2: Zusammensetzungen der Variationen 1-5 (Angaben jeweils in g).

Substanz	Variation 1	Variation 2	Variation 3	Variation 4	Variation 5
BM-17-V				0,05	0,05
Nerzöl	2,5	2,5	2,5	2	2
Glycerol	1	1	1	1	1
Lanette N	4		3	3,5	3,0
Bienenwachs		3	1		
Sheabutter		1			
Cetiol-V				1	1
Isopropylmyristat					0,5
Ethanol	5,0	5	6	6	5
Citral	0,25	-	-	-	-
Wasser	37,50	37,5	36,5	36,5	37,5
Nipagin	+	+	+	+	+
Nipasol	+	+	+	+	+

3.2.2. Einarbeitung von IPA und IPM

Die Einarbeitung von zusätzlichen permeationsfördernden Substanzen in die fertig hergestellten AB-Grundlagen erfolgte mit Hilfe eines Unguators (GAKO Konietzko GmbH, D-Bamberg) (Abbildung 15). Der Unguator ist ein Rührwerk für Salben, bei dem die Zubereitung direkt in einer Spezialkruke, der sogenannten Unguatkruke, mit einem Flügelrührer hergestellt wird (Konietzko 1996).



Abbildung 15: Unguator (GAKO Konietzko GmbH, D-Bamberg)

3.2.3. Einarbeitung von Betamethason-17-valerat

Der Arzneistoff wurde in die fertig hergestellten Grundlagen mit Hilfe eines Unguators eingearbeitet. Dazu wurde etwa die Hälfte der Grundlage in eine Unguatorkrücke eingewogen, der Arzneistoff dazugegeben und mit der restlichen Creme aufgefüllt. Die Homogenisierung erfolgte 2 Minuten lang bei 2000 UpM. Die eingearbeitete Konzentration von BM-17-V entsprach 0,1 % (m/m).

3.2.4. Bestimmung der Sättigungskonzentration von Betamethason-17-valerat in verschiedenen Lösungsmitteln

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von BM-17-V in verschiedenen Lösungsmitteln wurde BM-17-V im Überschuss zu dem jeweiligen Medium zugegeben und 24 Stunden bei 20°C mit Hilfe eines Magnetrührers bei 150 UpM gerührt. Anschließend wurde die Suspension durch einen Celluloseacetatfilter (0,22 µm Filter Unit for sterilizing filtration OptexTM - GS) filtriert. Der Arzneistoffgehalt des Filtrats wurde mittels HPLC ermittelt.

3.2.5. Bestimmung der Sättigungskonzentration von Betamethason-17-valerat in den Grundlagen

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von BM-17-V in verschiedenen Grundlagen wurde BM-17-V in aufsteigenden Konzentrationen in die jeweilige Grundlage eingearbeitet. Die

Probe wurde 1 Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Einen Tag nach der Herstellung erfolgte die Beurteilung der Proben auf optische Anisotropie. Das Verfahren erfolgte mit dem Polarisationsmikroskop Zeiss Photomikroskop III (Zeiss, D-Oberkochen) zwischen gekreuzten Polarisatoren (Objektiv 10 x 0,22). Das in den Strahlengang eingefügte Lambda-Plättchen erzeugte hierbei einen Gangunterschied von 550 nm. Die Beobachtungen wurden fotografisch dokumentiert. Als Sättigungskonzentration wurde die Arzneistoffkonzentration definiert, bei der erstmalig Kristalle im Polarisationsmikroskop detektiert werden konnten.

3.2.6. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten n-Oktanol/Wasser

Für die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurden 5,0 ml gesättigte, wässrige Arzneistofflösung zu 5,0 ml wassergesättigter Oktanollösung gegeben und 24 Stunden bei 20°C auf dem Magnetrührer gerührt. Nach vollständiger Phasentrennung wurde der Arzneistoffgehalt der wässrigen Phase bestimmt und auf den Gehalt der Oktanolphase durch Differenzbildung rückgeschlossen. Der Verteilungskoeffizient VK_{oct} wurde durch Division von C_{oct} und C_{wasser} bestimmt. Es wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt.

3.2.7. Bestimmung der Phasenlage von Cremes

Die Phasenlage der Cremes wurde durch Anfärben mit Sudanrot G (Merck, D-Darmstadt) und Methylenblau (Merck, D-Darmstadt) bestimmt. Nach 15 Minuten wurde überprüft, ob sich der jeweilige Farbstoff gelöst hatte.

3.2.8. Karl-Fischer- Titration

Der Wassergehalt der Zubereitungen wurde mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt. Es wurde ein 701 KF Titrino mit 703 TI Titrierstand (Metrohm, D-Filderstadt) verwendet. Für die Titration wurde Methanol (Fisher Chemicals UK Limited, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leicester) vorgelegt und mit Hydranal® - Composite 5 K (Riedel de Haen, D-Seelze) titriert. Die Methode wurde mit Hydranal®-Water Standard 10,0 (Riedel de Haen, D-Seelze) kalibriert.

3.2.9. Thermogravimetrie (TG)

Die Proben wurden in offenen Aluminiumtiegeln SSC000E030 (C3 Analysentechnik, D-Baldham) mit einer TG/DTA 220 mit Diskstation 5200H (Seiko, J-Tokyo) gemessen. Die Heizrate betrug 5°C/min, gemessen wurde bis 130 °C. Die Einwaage betrug 5-10 mg.

3.2.10. Freisetzungsuntersuchungen

Die Freisetzungsuntersuchungen wurden mit den hergestellten halbfesten Zubereitungen als Donatoren in modifizierten Franz-Zellen bei 37 °C durchgeführt (Abbildung 16).

Es wurden jeweils 4 Versuche parallel für jede Formulierung durchgeführt. Als Akzeptor wurde isotoner Phosphatpuffer pH 7,4 eingesetzt. Die verwendeten Zellen hatten eine Freisetzungsfläche von 0,5 - 0,64 cm² und ein Akzeptorvolumen von 5,0 bis 7,4 ml. Ein Magnetrührer (150 UpM) durchmischte den Akzeptor während der gesamten Versuchsdauer. Um einen Wassereinstrom in die Donorphase zu verhindern, wurden Donor und Akzeptor mit einer silikonisierten Dialysemembran Spektra/Por MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles, Ca.) voneinander separiert. Diese Membran wurde mit Polymethylsiloxan imprägniert. Hierzu wurde die Membran zunächst in Wasser hydratisiert und dann für 2 Minuten in eine 2 % (V/V) Lösung von Silikonöl AK 350 (Wacker, D-München) in Diethylether p.a (Merck, D-Darmstadt) eingelegt. Die Membran wurde in Franz-Zellen eingespannt und diese anschließend in horizontale Position gebracht. Es wurde erneut eine 2%-ige Silikonlösung aufgebracht und der Ether abdunsten gelassen, so dass eine Konzentration von 1,2 mg Silikonpolymer pro cm² sichergestellt war.

Die Freigabeuntersuchungen wurden über 8 Stunden durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte alle 60 Minuten mit einer 250 µl-Hamilton-Spritze 1725 RN (Hamilton, CH-Bonaduz). Die entnommenen Probenvolumina von 250 µl wurden durch frische Pufferlösung ersetzt. Der Arzneistoffgehalt der Proben wurde mittels HPLC bestimmt.

Die Arzneistofffreisetzung aus Salben ist diffusionskontrolliert, d.h., die Diffusionsgeschwindigkeit der Arzneistoffmoleküle aus dem Salbenvolumen zur Grenzfläche Salbe/Haut bestimmt die Kinetik.

Für die Lösungssalben gilt die Gleichung 1, für Suspensionssalben gilt die Gleichung 2 (siehe 2.3.6.)

Die freigegebene Menge an Arzneistoff M ist somit eine lineare Funktion der Wurzel aus der Zeit (Higuchi-Plot). Aus der Steigung $k = A \cdot \sqrt{2c_0 \cdot c_s \cdot D}$ lässt sich bei bekannter Anfangskonzentration, Fläche und Diffusionskoeffizient die Sättigungskonzentration (c_s) ermitteln.

3.2.11. Permeationsuntersuchungen

3.2.11.1. Präparation des isolierten humanen Stratum corneum

Die verwendeten Hautstücke stammten aus der Plastischen Chirurgie. Es handelte sich um pathologisch nicht veränderte Haut aus dem Bauchbereich. Direkt nach Entnahme wurde die Haut gekühlt und mechanisch vom Unterhautfettgewebe und einem Teil der Dermis befreit. Anschließend wurden die Hautstücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zum Versuchsbeginn gelagert. Das Stratum corneum wurde von den Hautstücken durch Behandlung mit Trypsin gewonnen [Kligman und Christophers, 1964]. Die Hautstücke wurden hierzu auf ein mit 2 %-iger (m/V) Trypsinlösung (Pankreasprotease, Merck, D-Darmstadt) getränktes Filterpapier mit der Dermis nach unten gelegt. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C wurde das Stratum corneum abgezogen, in 0,02 % (m/V) Trypsininhibitorlösung (Type II-O: Chicken egg white; Sigma, D-Steinheim) gespült, gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das SC wurde nicht länger als 4 Monate nach der Isolierung verwendet, um etwaige zersetzungsbedingte Veränderungen während der Lagerung im Exsikkator zu vermeiden.

3.2.11.2. Durchführung der Permeationsuntersuchungen

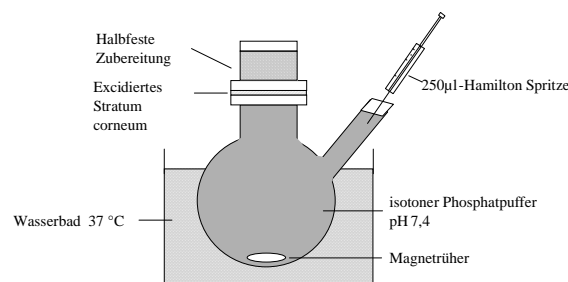


Abbildung 16: Das Modell der Franz-Zelle

Mit Permeationsuntersuchungen in einer modifizierten Franz-Zelle [Franz, 1975] bei 37°C ist die Bestimmung, in welchem Ausmaß ein Arzneistoff das Stratum corneum in Abhängigkeit

von der Zeit durchtritt, möglich (siehe Abbildung 16). Alle Franz-Zellen hatten einen Durchmesser von 0,6 cm. Das Stratum corneum wurde bei diesem Versuchsaufbau auf einem Polycarbonat-filter TMTP 5 µm (Isopore® membrane filters, Millipore, Ireland) belassen. Beide Glasschliffe der Franz-Zelle wurden zur besseren Abdichtung mit einer Silikonzubereitung behandelt.

Als Donator dienten handelsübliche Fertigarzneimittel und die hergestellten halbfesten Zubereitungen. Das Akzeptormedium war ein isotoner Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS Tablets von Firma (ICN Biomedicals Inc.,)). Ein Magnetrührer (150 U/min) sorgte für die Dauer des Versuchs für eine gleichmäßige Akzeptordurchmischung.

Um Verdunstungsprozessen entgegenzuwirken, wurden die Öffnungen der Franz-Zelle über die Versuchsdauer mit Tesafilm verklebt. Die Probenentnahme erfolgte stündlich über einen Zeitraum von 30 Stunden mit einer 250 µl-Hamilton Spritze 1725 RN. Die entnommenen Probenvolumina von 250 µl wurden umgehend durch frische Pufferlösung ersetzt. Der Arzneistoffgehalt der Proben wurde mittels HPLC bestimmt.

Das Ausmaß der Permeation wird sowohl von den physiko-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs als auch von den möglichen Interaktionen mit Stratum corneum Bestandteilen bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass perfekte sink-Bedingungen herrschen, kann die pro Zeit- und Flächeneinheit permeierte Wirkstoffmenge als Arzneistoffflux J [g/cm²s] mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$J = P \cdot c \quad (\text{Gleichung 6})$$

c - Ausgangskonzentration an Wirkstoff im Vehikel [g/cm³]

P - Permeationskoeffizient [cm/s]

Die Gleichung 7 beschreibt den Zusammenhang zwischen effektiver Hautdicke h [cm], dem Verteilungskoeffizient K , dem scheinbaren Diffusionskoeffizient D [cm²/s] und dem Permeationskoeffizient P [cm/s].

$$P = \frac{D \cdot K}{h} \quad (\text{Gleichung 7})$$

3.2.12. Permeation durch künstliche Hautkonstrukte (Artificial skin constructs = ASC)

Für vergleichende Permeationsuntersuchungen wird üblicherweise Stratum corneum verwendet. Allerdings sind die Ergebnisse vom Spender (Alter, Sex, exzidierten Ort) abhängig. Dieses gilt als Nachteil, weil Permeationsuntersuchungen durch SC von unterschiedlichen Spendern nicht miteinander verglichen werden können. Für Hautkonstrukte ist eine Unabhängigkeit von diesen Faktoren nachgewiesen worden (Specht et al., 1998), deswegen können sie für Permeationsstudien als Standard eingesetzt werden. Um eine Standardisierung und Vergleichbarkeit von Permeationsstudien zu erreichen, werden Hautkonstrukte (ASC) eingesetzt.

3.2.12.1. Aufbau der Hautäquivalente

Der Aufbau der Hautäquivalente erfolgte in einem Transwell® Membraneinsatz für 6-Well-Makrotiterplatten (Costar, D-Fernwald) gemäß einer von Specht entwickelten und von Wassermann modifizierten Methode [Specht et al., 1998, Wassermann und Müller-Goymann, 2000] (Abbildung 17). Zunächst wurde aus humanen dermalen Fibroblasten eingebettet in einem Kollagengel ein Dermisäquivalent hergestellt (200.000 Zellen/ 6 Hautäquivalente). Nach Ablauf einer Woche wurden auf dieses kontrahierte Gelgerüst 50 µl einer HaCaT-Zellsuspension (Passage 68-76; mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml) aufgebracht und diese eine Woche bis zum konfluenten Stadium mit Ready-Mix überschichtet kultiviert. Anschließend wurde der Mediumspiegel abgesenkt, so dass sich das Hautäquivalent zur Grenzfläche an der Luft befand, und MSBM 2 % zur weiteren Kultivierung verwendet. Die Ausbildung einer differenzierten und stratifizierten Epidermis erfolgte innerhalb von weiteren zwei Wochen.

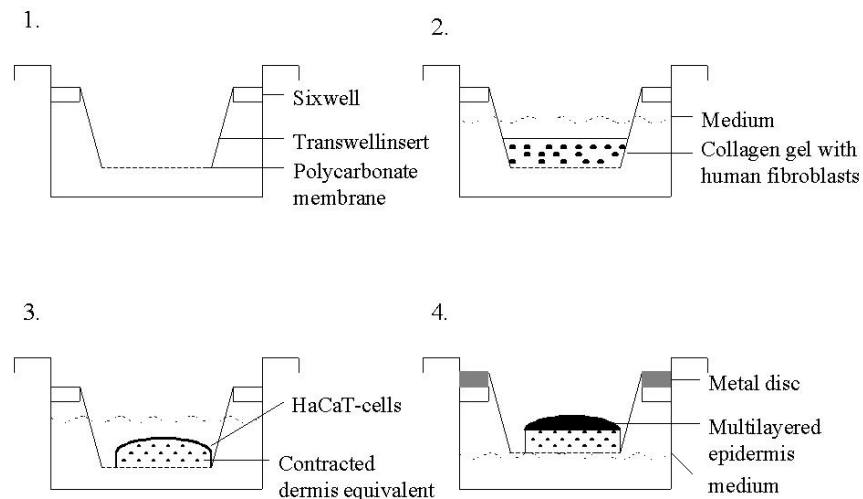


Abbildung 17: Schematische Darstellung der ASC-Herstellung [Hoffmann und Müller-Goymann, 2005]

3.2.12.2. Permeation durch die Hautkonstrukte

Die Permeationsuntersuchungen durch ASC wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Permeationen durch das exzidierte humane Stratum corneum (siehe 3.2.11.2.) durchgeführt. Statt Stratum corneum wurde bei diesem Versuchsaufbau das Hautkonstrukt auf einem Polycarbonatfilter belassen.

3.2.13.Extraktion des Stratum corneum

Nach dem Permeationsexperiment wurde das Stratum corneum vorsichtig vom Donor- und Akzeptor-Kompartiment getrennt. Mit Hilfe von Filterpapier wurde das Stratum corneum von eventuellen Resten der Formulierung gereinigt und für 24 h in 0,25 ml Extraktionsmittel (0,4 % (w/w) Phosphorsäure 85 % in 100 g Acetonitril) eingelegt. Danach wurde das Stratum corneum mit weiteren 0,25 ml Extraktionsmittel gewaschen. Beide Phasen wurden vereinigt und abschließend mit Hilfe der HPLC untersucht. Die gefundenen Mengen an BM-17-V wurden in µg/mg Stratum corneum dargestellt.

3.2.14. HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe

3.2.14.1. Betamethason-17-valerat und seine Abbauprodukte

Die permeierte Menge an Arzneistoff wurde mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC-System Beckman System Gold Solvent Delivery system 126 (Beckman, D-München) und UV-Detector Beckman System Gold Detector Module 166 (Beckman, D-München) durchgeführt. Es wurde eine Reversed Phase RP Säule (250x4 mm) von Grom-Sil 120 ODS-3, CP 5 μm (Grom, D-Herrenberg) verwendet, die mobile Phase bestand aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 60/40 (V/V). Flussrate 1 ml/min, resultierender Druck: 105-110 bar, Wellenlänge: 264 nm, Retentionszeit: Prednisolon – 2,1 min, BM – 2,8 min, BM-17-V – 7,4 min, BM-21-V 8,66 min.

Es wurden jeweils acht Kalibrierlösungen eines Wirkstoffs in der mobilen Phase in einer Konzentration von 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hergestellt und dreifach analysiert. Die lineare Korrelation zwischen der Peakfläche und der Konzentration des Wirkstoffes wurde innerhalb des Konzentrationsbereiches von 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bis 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durchgeführt. Die Linearität wurde durch den Korrelationskoeffizient ausgedrückt. Die Korrelationskoeffizienten betrugen 0,98241 für Betamethason; 0,99808 für Betamethason-17-valerat, und 0,999988 für Prednisolon. Die Präzision der Methode wurde durch die relative standard deviation (RSD) ausgedrückt. RSD wurde aus dem Anstieg der Kurve Peakfläche/ Konzentration berechnet. RSD betrug 5.0 % und 4.2 % für BM und BM-17-V. Das Detektionslimit (LOD) ist die kleinste Menge des Analyten, welche ermittelt aber nicht zwangsläufig quantifiziert werden kann. Die LOD – Werte betrugen $12.0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ und $8.0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ für BM und BM-17-V.

3.2.14.2. Hydrocortison

Die permeierte Menge an Arzneistoff wurde mittels HPLC quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC-System der Fa. Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus einem Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 plus (Probenauftrag 20 μl) und einem UV-Detektor 486 bestand. Die Auswertung erfolgte mit einer Waters Millenium 32 Chromatography Manager Software.

Reversed Phase RP Säule (250 x 4 mm) Hypersil ODS, 5 μm , Herrenberg-Kayh Deutschland, die mobile Phase bestand aus Methanol/Wasser im Verhältnis 60/40 (V/V).

Flussrate 1,0 ml/min, resultierender Druck: 105-110 bar, Wellenlänge: 250 nm, Retentionszeit 4,48 min. Es wurden jeweils vier Kalibrierlösungen des Wirkstoffs in der mobilen Phase in einer Konzentration von 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hergestellt und dreifach

analysiert. Der Korrelationskoeffizient (R^2) war 0,997005 für eine Mehrpunktkalibrierung im Bereich von 1-15 µg/ml, RSD = 4,52 %, LOD = $36,0 \times 10^{-2}$ µg/ml

3.2.14.3. Betamethason-17-valerat und seine Abbauprodukte in konservierten Cremes

Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC-System der Fa. Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus einem Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 plus (Probenauftrag 20 µl) und einem UV-Detektor 486 bestand. Die Auswertung erfolgte mit einer Waters Millennium 32 Chromatography Manager Software.

Reversed Phase RP Säule (125 x 3 mm) Grom Sil 120 ODS-3 CP, 5 µm, Grom Sil Deutschland, die mobile Phase bestand aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 25/75 (w/w).

Flussrate 1,0 ml/min, Wellenlänge: 253 nm, Retentionszeit Nipagin 2,39 min, BM 4,33 min. Es wurden jeweils vier Kalibrierlösungen jeder zu bestimmenden Substanz in der mobile Phase in einer Konzentration von 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 µg mL⁻¹ hergestellt und dreifach analysiert. Für Nipagin betrugen R^2 - 0,999941, RSD - 1,47 %, LOD- $24,0 \times 10^{-2}$ µg/ml. Für BM betrugen R^2 - 0,999981, RSD - 0,9 %, LOD - $12,0 \times 10^{-3}$ µg/ml

3.2.15. Dichtebestimmung

Die Dichtebestimmung halbfester Systeme wurde mit Hilfe eines Luftvergleichs-Pyknometers (Beckman, D-München) ermittelt.

3.2.16. pH-Meter

Für die Überprüfung selbst hergestellter Phosphat-Pufferlösungen wurde der pH Wert der Lösungen potentiometrisch bestimmt. Benutzt wurde hierzu ein Microprozessor Präzisions-pH-Meter 539 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, D-Weilheim) mit Mettler Toledo Glaselektrode Inlab 426. Das Gerät wurde mit Standard-Pufferlösungen pH 4,66 und pH 9,00 (Merck, D-Darmstadt) kalibriert.

Für die Überprüfung des pH Wertes selbst hergestellter Grundlagen wurde eine Elektrode mit Flachmembran Inlab® 426 (Mettler Toledo, CH-Uhrdorf) verwendet.

3.2.17. DSC- Untersuchung

Vor den röntgenographischen und thermoanalytischen Messungen wurde das Stratum corneum für 2 Tage im Exsikkator über gesättigter NaCl-Lösung (relative Luftfeuchte: 75,2 %

bei Raumtemperatur) auf einen Wassergehalt von 20 % hydratisiert. Es wurde 10-12 mg Stratum corneum abgewogen und in der Salbengrundlage für 30 min bei 37 °C in einer geschlossenen Petrischale zur Vermeidung von Wasserverlusten in den Trockenschrank gestellt. Nach 30 Minuten wurde SC mit Filterpapier von den Resten der Zubereitungen abgetupft und in hermetisch verschlossenen Aluminium-Tiegeln vermessen. Für den analytischen Vergleich der wasserfreien Zubereitungen wurde als Standard das hydratisierte SC (Wassergehalt 20 %) genommen, während für den Vergleich mit den wasserhaltigen Formulierungen vollhydratisiertes SC (Wassergehalt 100 %) herangezogen wurde. Um Vollhydratation zu erreichen, wurde das SC für 30 min ins Wasser getaucht. Die Zubereitung wurde zusätzlich separat gemessen. Die Einwaage betrug 4-5 mg.

Die Messung erfolgte im Temperaturbereich von -20 bis +130 Grad bei einer Heizrate von 5°C/min.

3.2.18. Bestimmung des pH-Optimums für die chemische Stabilität von BM-17-Valerat

Es wurden Phosphatpufferlösungen mit pH 4,5; 5,5; 6,8; 7,4 nach Ph.Eur.2004 hergestellt. Der Wirkstoff wurde in den Lösungen gelöst, so dass gesättigte Lösungen entstanden. Für die Experimente wurden für jede Reihe 3 x 10 ml der jeweiligen Lösung eingesetzt. Die Experimente wurden in Reagenzgläsern bei 37 °C durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte stündlich über einen Zeitraum von 30 Stunden mit einer 250 µl-Hamilton Spritze 1725 RN. Die entnommenen Probenvolumina von 250 µl wurden umgehend durch Pufferlösung ersetzt. Der Arzneistoffgehalt der Proben wurde mittels HPLC bestimmt.

3.2.19. Bestimmung der enzymatischen Metabolisierung von BM-17-Valerat

Es wurden Phosphatpufferlösungen mit pH 4,5; 5,5; 6,8; 7,4 nach Ph.Eur.2004 hergestellt. Der Wirkstoff wurde in den Lösungen gelöst. In die gesättigten Lösungen (Volumen-10 ml) wurden die Hautkonstrukte (ASC) aus dem Zellkulturlabor TU BS gegeben. Die Experimente wurden bei 37°C und bei 4°C durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte stündlich über einen Zeitraum von 30 Stunden mit einer 250 µl-Hamilton Spritze 1725 RN. Die entnommenen Probenvolumina von 250 µl wurden umgehend durch frische Pufferlösung ersetzt. Der Arzneistoffgehalt der Proben wurde per HPLC bestimmt. Für die Bestimmung des Abbaues des BM-21-valerats in BM wurden die BM-17-V Lösungen zuerst über 24 Stunden bei 37°C belassen, damit eine Umesterung in das C-21 Derivat erfolgte. Danach wurde die gleiche Untersuchung wie für BM-17-V durchgeführt.

3.2.20. Bestimmung der Stabilität des BM-17-valerats in Salben und Cremes

Für die Untersuchung der Stabilität des Wirkstoffes in der Grundlage, wurde die Zubereitung gemäß 3.2.1.6. hergestellt. Die Proben wurden in Tuben bei zwei unterschiedlichen Lagerbedingungen (Raumtemperatur und 4 °C) über 40 Tage gelagert. Für jedes Experiment wurden zwei Tuben verwendet. Aus jeder Tube wurden zwei Stichproben genommen. Zur Extraktion des Arzneistoffes aus den Cremes wurde 0,5 g Creme mit 10,0 ml Methanol in HPLC-Qualität geschüttelt und auf 40 °C erwärmt. Dann wurde die Probe 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und 10 Minuten bei 600 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen 50 ml-Messkolben überführt. Der Cremerückstand wurde noch zweimal nach dieser Prozedur behandelt. Die vereinigten Überstände wurden auf 50 ml mit Methanol aufgefüllt und per HPLC in Doppelbestimmungen analysiert.

3.2.21. Rheologie

Rheologische Untersuchungen wurden an einem Rheometer Typ CVO/CS der Firma Bohlin Instruments (D-Mühlacker) durchgeführt. Als Messgeometrie diente die Kegel-Platte-Einrichtung CP 4/40 mit einem Kegelöffnungswinkel von 4° und einem Durchmesser von 40 mm. Der Messspalt betrug 150 µm. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 20 °C.

3.2.22. Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)

3.2.22.1. Röntgenweitwinkelbeugung nach Debye-Scherrer

Hydratisiertes und in die jeweilige Formulierung eingelegtes Stratum corneum wurde für 30 min bei 37°C gelagert und danach vorsichtig mit Filterpapier von der Formulierung befreit. WAXD - Untersuchungen vom unbehandelten und behandelten SC wurden über 24 h in einer rotierenden Glaskapillare 0,5 mm (Glas, D-Berlin) mit einer Debye- Scherrer Röntgenkamera PW 1024/10, DY 3065/11 cm (Philips, D-Kassel) durchgeführt. Die Kamera war mit einem Generator PW 1830, 40 kV 7 40 mA, Fa.PANalytical, der eine Röhre PW 2253/11 (Ni-Filter, CuK α -Strahlung, $\lambda=0,154$ nm, Beschleunigungsspannung 40 kV, Anodenstrom 40 mA (Philips, D-Kassel) beinhaltet, verbunden. Die Detektion von Interferenzen wurde durch die Schwärzung eines Röntgenfilmes Agfa D7 (Entwickler: Agfa Strukturix G 128, Fixierer: Agfa Strukturix G 128) (Agfa, D-Köln) erreicht. Um den Durchmesser der geschwärmten Ringe auf dem Film zu bestimmen, wurde ein fest einstellbarer Zirkel mit zwei Metallspitzen

verwendet. Der ermittelte Abstand wurde auf einem Messschieber übertragen, so dass der Durchmesser von verschiedenen Ringen vergleichend bis auf 0,05 mm bestimmt werden konnte. Die Netzebenenabstände wurden anhand der registrierten Interferenzen über die Bragg'sche Gleichung berechnet.

3.2.22.2. Röntgenweitwinkelbeugung

Röntgenweitwinkelanalyse wurde mit Hilfe eines Goniometers PW3050/60 MPD-System (PANalytical, 7600 AA Almelo, The Netherlands) durchgeführt. Das Goniometer wurde auf einem Röntgengenerator PW3040/60 X`Pert Pro Fabr.:DY2171 mit einer Röhre PW3373/00 DK147726 Cu LFF betrieben. Es enthielt einen Detektor Pre FIX X`Celerator, Sample stage Spinner PW3064, einen Probenträger aus Edelstahl PW1811/00. Die Auswertung der Interferenzen erfolgte mit der Analysenssoftware X`Pert High Score.

3.2.22.3. Röntgenkleinwinkelbeugung nach Kiessig

Die Kleinwinkel-Röntgenuntersuchung wurde mit einem Röntgengoniometer PW 1050/25 (Philips, D-Kassel) durchgeführt. Das Goniometer wurde auf einem Röntgengenerator PW 1730/10 (Fa.PANalytical BV, Achtseweg Noord 5, NE-5651 GG Eindhoven, Netherlands) mit einer Röhre PW 2213/20 (Feinfokus / Cu - Anode, $\lambda=0,154$ nm, bei einer Beschleunigungsspannung 40 kV und einem Anodenstrom von 25 mA) betrieben.

Probenhalter aus Aluminium, Kiessig-OED (Fa.M.Braun, Gutenbergstr, D-85748 Garching)

Die Auswertung der Interferenzen erfolgte mit der Analysenssoftware ASA - SAXS M.Braun.

3.2.23. Statistische Auswertung

Zur Überprüfung, ob die röntgenographisch ermittelten Netzebenenabstände der gleichen Grundgesamtheit angehören, wurde ein zweiseitiger Student-t-Test durchgeführt. Hierbei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 zugrunde gelegt. Für die Auswertung der Permeationsuntersuchungen wurde auch der Student-t-Test verwendet.

3.2.24. Dünnschichtchromatographie (DC)

Sorptionsschicht: Kieselgel 60 F₂₅₄ (lufttrocken) (Merck, D-Darmstadt), Fließmittel: Ethylmethylketon/Toluol 40/60 (V/V). Untersuchungslösung: jeweils 2 mg BM, BM-17-V, Prednisolon, Hydrocortison oder Prednicarbat und die untersuchte Grundlage wurden in

1 ml Methanol gelöst. Je Lösung wurden 5 µl (entsprechend 1,2 cm einer Schmelzpunktkapillare) getrennt auf die Startlinie aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Platte vor dem Entwickeln 15 min lang an der Luft liegen lassen und unter UV-Licht von 254 nm überprüft.

3.2.25. Prüfung auf Identität der fluorierten Kortikoide nach Ph.Eur.

Etwa 2 mg Substanz werden unter Schütteln in 2 ml Schwefelsäure R gelöst. Innerhalb von 5 min entwickelte sich eine intensive rötlichbraune Färbung. Die Lösung wurde zu 10 ml Wasser R gegeben. Nach dem Mischen verblasste die Färbung, und die Lösung blieb klar.

4. Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1. Dermale Systeme mit Betamethason-17-valerat für die topische Applikation

4.1.1. Sättigungslöslichkeit von BM-17-V in verschiedenen Lösungsmitteln

Tabelle 3: Sättigungskonzentration von BM-17-V in unterschiedlichen Lösungsmittel bei 20°C

Lösungsmittel	Cs [$\mu\text{g/ml}$]
IPM	250
Wasser	5
Miglyol	60

4.1.2. Charakterisierung der BM-17-V-haltigen halbfesten Zubereitungen aus DAB und DAC

Tabelle 4: Sättigungskonzentration von BM-17-V in unterschiedlichen Formulierungen bei 20°C

Grundlage (Wassergehalt in %)	Cs [% m/m]
HS	0,010
WHS (70 %)	0,010
NHC (50 %)	0,009
WWS (50 %)	0,009
Basiscreme DAC (40 %)	0,010
WS	0,000505

In den Tabellen 3 und 4 sind die Sättigungskonzentrationen (Cs) von BM-17-V in verschiedenen Lösungsmitteln sowie in den DAB Grundlagen dargestellt. Die Abbildung 18 zeigt polarisationsmikroskopische Aufnahmen von 0,1 %-igen BM-17-V-Formulierungen bei RT einen Tag nach der Herstellung. Alle Zubereitungen mit einer eingearbeiteten Wirkstoffkonzentration von 0,1 % sind Suspensionsformulierungen, da in allen Proben anisotrope Kristalle detektiert werden konnten.

Das beste Lösungsvermögen für BM-17-V zeigten die Grundlagen HS, WHS und Basiscreme DAC. Die wasserfreie Hydrophile Salbe (HS) enthält Cetylstearylalkoholsulfat zusammen mit Cetylstearylalkohol in 30%-iger Konzentration, welcher die Löslichkeit von Kortikoiden erhöht. In HS bildet der emulgierende Cetylstearylalkohol eine eigene feste Phase, in der Arzneistoffe solubilisiert werden können, was sich als Erhöhung der Löslichkeit bemerkbar

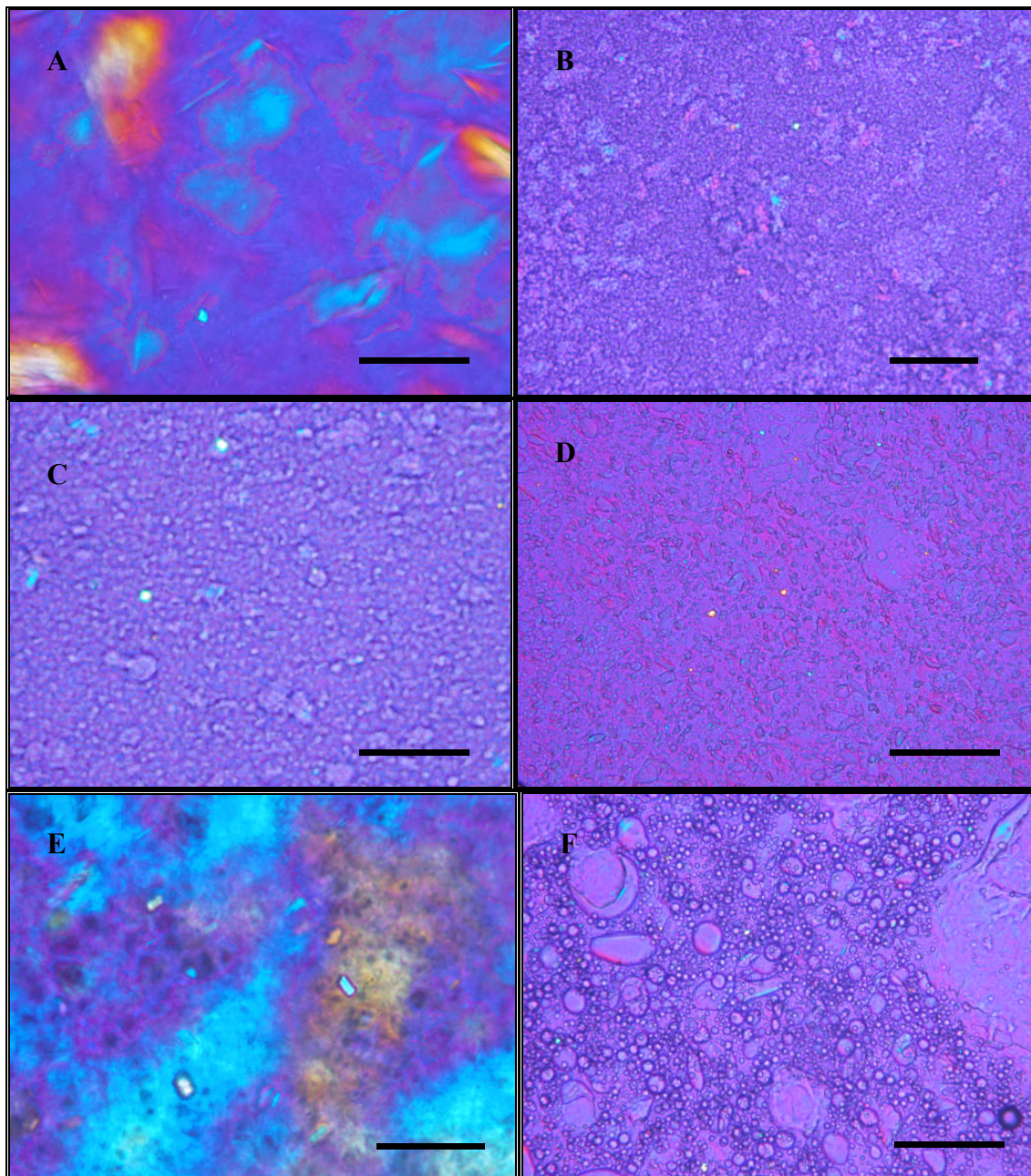


Abbildung 18: Polarisationsmikroskopische Aufnahme von A - 0,1% WS, B - 0,1 % Basiscreme DAC, C - 0,1 % NHC, D - 0,1 % WHS, E - 0,1 % WWS, F - 0,1 % HS; alle Zubereitungen enthalten BM-17-V; RT; 1 Tag nach der Herstellung (Balken = 50 µm)

macht; für die Liberationsgeschwindigkeit ist jedoch die Konzentration des in der äußeren Vaselinephase gelösten Arzneistoffs bestimmend [Loth, 1979]. Gleich hohe Sättigungslöslichkeiten zeigten die wasserhaltigen Cremes WHS und Basiscreme. Die Grundlage WHS enthält 70 % Wasser, die Basiscreme enthält jedoch nur 40 %.

Die Sättigungskonzentration des Wirkstoffes in diesen Grundlagen liegt jedoch noch um das 10 Fache niedriger als der eingearbeiteten Konzentration entspricht.

Geringfügig niedrigere Cs Werte, jedoch noch gute Lösungseigenschaften für BM-17-V zeigten die Grundlagen WWS und NHC. Die beiden Grundlagen enthalten die gleiche Wassermenge mit jeweils 50 %, daher ist ein ähnliches Lösungsvermögen der beiden Grundlagen zu erwarten. Die Zubereitungen sind aber unterschiedlich vom Emulsionstyp, deswegen wird der Wirkstoff in der Zubereitung, entweder in der dispersen oder kontinuierlichen Phase in erhöhter Konzentration gelöst. Die bessere Löslichkeit des Wirkstoffes in der kontinuierlichen Phase könnte eine erleichterte Wirkstoffliberation aus dem Vehikel zur Folge haben. Loth postulierte, dass die Grundlage WHS (O/W) ein höheres Liberationsvermögen als die WWS (W/O) besitzt, weil das Wasser in der WHS die äußere Phase bildet [Loth, 1981]. Der höhere Wasseranteil in der WHS könnte das höhere Lösungsvermögen im Vergleich zu NHC, die auch ein O/W System darstellt, erklären.

Die niedrigsten Cs-Werte hat der Arzneistoff in der Grundlage WS. Das Vaseline, dessen Anteil in der Zusammensetzung 93,5 % ist, verschlechtert die Löslichkeit des Wirkstoffes. Der Unterschied in der Sättigungskonzentration des BM-17-V in WS zu den anderen Grundlagen liegt um den Faktor 20 niedriger. Die Cs ist 200 mal kleiner als die eingearbeitete Konzentration.

4.1.3. Charakterisierung BM-17-valerathaltiger Fertigarzneimittel: Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe

Um die in der Arbeit untersuchten Cremes und Salben mit im Handel erhältlichen Formulierungen vergleichen zu können, sollten in den folgenden Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen die selbst hergestellten Zubereitungen mit BM-17-V-haltigen Fertigarzneimitteln zur topischen Anwendung verglichen werden:

- Soderm® Salbe
- Celestan-V® Salbe
- Celestan-V® Creme

Alle Zubereitungen sind Suspensionssalben (Abbildung 19)

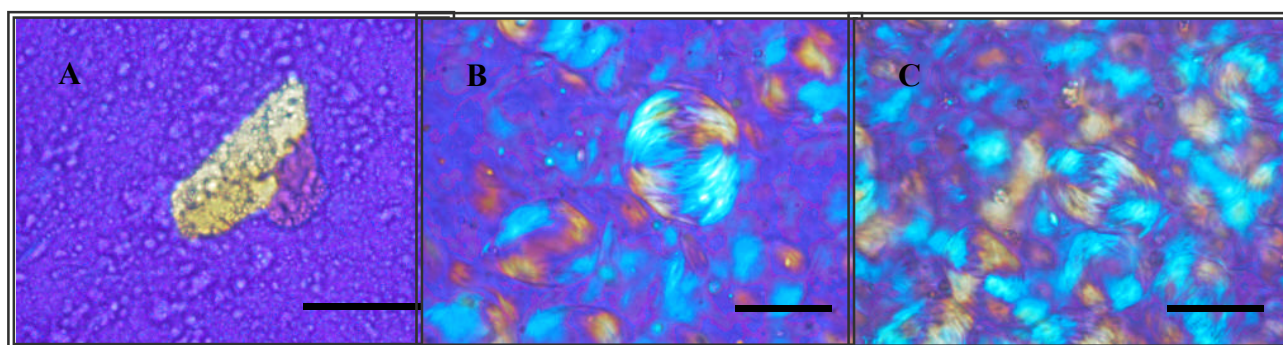


Abbildung 19: A - Celestan-V Creme, B - Celestan-V® Salbe, C- Soderm® Salbe (Balken 50 µm)

Die verwendeten Hilfsstoffe sind nicht quantitativ in der Gebrauchsinformation aufgelistet. Dennoch ist laut der qualitativen Zusammensetzung und aufgrund des ermittelten Wassergehalts ein Vergleich zwischen den kommerziellen Produkten und den selbst hergestellten Zubereitungen möglich. Celestan-V® Creme enthält 70 % Wasser und entspricht als O/W Creme in ihrer Zusammensetzung der WHS. Celestan-V® Salbe enthält Vaseline und Paraffin und ist daher noch lipophiler als WS. Eine ähnliche Zusammensetzung hat Soderm® Salbe, die dank des Wollwachsgehalts der WS entspricht. Soderm® Salbe enthält kein Wasser, wie in einer Karl-Fischer Titrationsuntersuchung ermittelt wurde.

4.2. Freisetzungsuntersuchungen

4.2.1. Freisetzungsuntersuchung von BM-17-V aus Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe

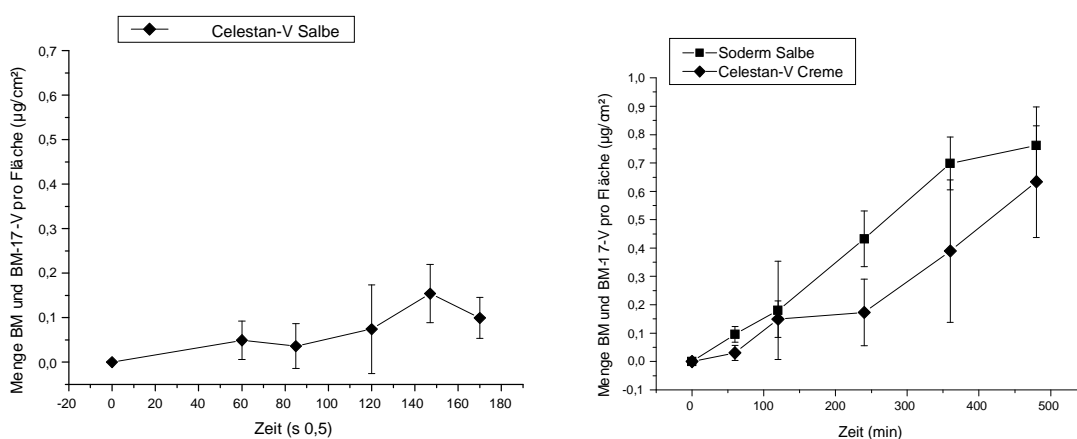


Abbildung 20: Freisetzung von BM-17-V und BM aus BM-17-V haltigen Systemen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,1 %: Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe, Soderm® Salbe, n=3

In Abbildung 20 sind die Freisetzungskurven von BM-17-V und seinem Hydrolyseprodukt BM aus den kommerziellen Produkten Soderm® Salbe, Celestan-V® Salbe und Celestan-V® Creme im Vergleich dargestellt. Im Laufe der Untersuchung wird nicht nur der eingesetzte Arzneistoff BM-17-V, sondern auch freier Alkohol BM freigesetzt. Dieser wurde zwar separat per HPLC quantifiziert (siehe Kapitel 3.2.13.) jedoch für die grafische Darstellung zusammen mit BM-17-V als Summe aufgetragen.

Aus der Soderm® Salbe erfolgt die Wirkstofffreigabe nach einer Kinetik Pseudo 0. Ordnung. Die Menge an freigesetztem Wirkstoff erreicht nach 7 Stunden 0,75 µg/cm². Die Freisetzung aus der wasserhaltigen Zubereitung Celestan-V® Creme (O/W, 70 % wässrige Phase) verläuft

nach einer Mischkinetik etwas langsamer ($0,6 \mu\text{g/ml}$ nach 7 Stunden). In Anbetracht der relativen Standardabweichungen ist allerdings festzuhalten, dass die Freisetzungsraten von BM-17-V aus Soderm® Salbe und Celestan-V® Creme ähnlich sind. Eine deutlich geringere Liberation von BM-17-V weist Celestan-V® Salbe auf ($0,15 \mu\text{g/ml}$ nach 7 Stunden), was um Faktor 5 weniger ist als bei Soderm® Salbe. Die Freisetzungskinetik entspricht einer Quadratwurzel-Kinetik. Alle kommerziellen Zubereitungen sind Suspensionsalben, daher erreicht die Freisetzungskurve kein Plateau. Der Wassergehalt in der Celestan-V® Creme zeigt im Vergleich zur wasserfreien Soderm Salbe keinen Einfluss auf die Liberation des Wirkstoffes. Vaseline und Paraffin, die Bestandteile der Celestan-V® Salbe sind, bilden eine vernetzte Gerüststruktur aus langkettigen Kohlenwasserstoffen mit eingelagerten kurzkettigen Kohlenwasserstoffen. Dadurch könnte es zur Reduzierung der Arzneistofflöslichkeit und entsprechend zur Abnahme der Konzentrationsgradienten kommen. Die c_s in den kommerziellen Produkten konnten nicht bestimmt werden, weil keine Placebo-Grundlagen zur Verfügung standen. Aber aufgrund der Zusammensetzung der Zubereitungen ist zu vermuten, dass BM-17-V in der Celestan-V® Salbe durch den hohen Paraffinanteil den niedrigsten c_s -Wert haben könnte, was eine verlangsamte Liberation verursachen würde. Die Wollwachsalkohole in der Soderm® Salbe könnten durch ihre guten emulgierenden Eigenschaften die Löslichkeit des Wirkstoffes in der Grundlage verbessern und damit die Liberation von BM-17-V aus dem Vehikel erhöhen.

4.2.2. Freisetzungsuntersuchung von BM-17-V aus verschiedenen Grundlagen des DAB und DAC

Abbildung 21 vergleicht die Freisetzung von BM-17-V aus den DAB- (Deutsches Arzneibuch) und DAC-Grundlagen (Deutscher Arzneimittelcodex). In alle Formulierungen wurde der Wirkstoff in einer Konzentration von $0,1 \text{ \% (m/m)}$, d.h. in der gleichen Konzentration wie in den kommerziellen Produkten, eingearbeitet. O/W-Cremes sind dann gut freisetzende Grundlagen, wenn der Arzneistoff wasserlöslich ist. Die beste Wirkstofffreigabe erfolgte aus der WHS (70 % Wasserphase) ($3,0 \mu\text{g/cm}^2$ nach 7 Stunden) und aus der WWS (50 % Wasserphase) ($2,25 \mu\text{g/cm}^2$ nach 7 Stunden). Die Freigabe aus WWS erfolgte in den ersten 6 Stunden nach der Quadratwurzel -Kinetik, die anschließend in eine Kinetik 0. Ordnung überging. Einen ähnlichen Liberationskurvenverlauf zeigte die Grundlage NHC (50 % Wassergehalt), die Arzneistofffreigabe erfolgte über die gesamte Versuchsdauer nach einer Quadratwurzel -Kinetik. Die Freisetzungswerte nach 7 Stunden waren aber etwas geringer ($1,5 \mu\text{g/cm}^2$). Die Fluxwerte der drei beschriebenen Grundlagen waren mindestens um das

2,5-fache höher als bei den Fertigprodukten Celestan-V® Creme und Soderm® Salbe (Tabelle 5).

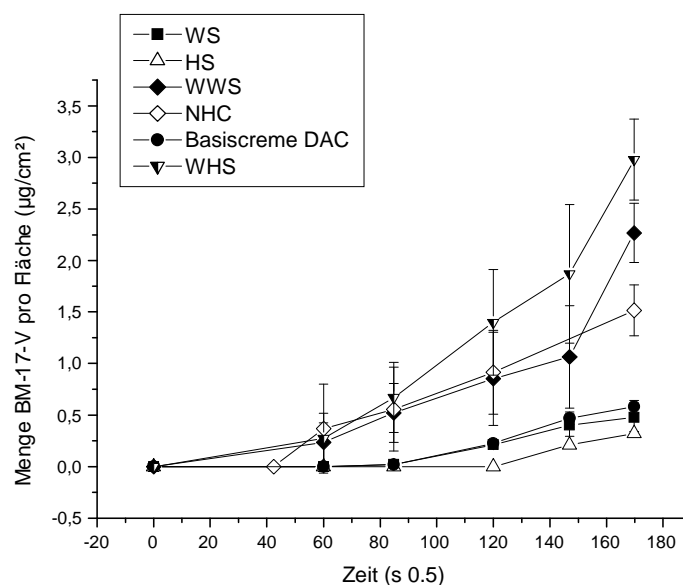


Abbildung 21: Freisetzung von BM-17-V aus BM-17-V-haltigen Systemen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,1 % WS, WHS, WWS, HS, NHC, Basiscreme, n=3

Bei wasserhaltigen Emulsionssalben spielt es eine große Rolle, ob das Wasser die innere oder die äußere Phase bildet. Wenn Wasser die äußere Phase einer Zubereitung darstellt, z.B. bei O/W-Emulsionszubereitungen, führt dies bei vielen Arzneistoffen zu schnellen *in vitro*-Liberationsgeschwindigkeit. Ist Wasser dagegen die innere Phase des Emulsionssystems, so sinkt sein Einfluss auf die Liberationsgeschwindigkeit, weil die freigesetzten Arzneistoffmoleküle die äußere lipophile Phase passieren müssen, die dann die Freisetzungsgeschwindigkeit weitgehend bestimmt [Loth, 1979].

Während die Höhe des Wassergehaltes bei W/O-Emulsionen einen relativ geringen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit hat, hängt sie bei O/W-Emulsionen in recht erheblichem Maße davon ab [Loth, 1981]. Das wird durch diese Studie bestätigt. Eine Erhöhung des Wasseranteils bis 70 % wie in der WHS, macht das verbesserte Liberationsverhalten im Unterschied zu NHC (50 % Wasser) deutlich. Die Freisetzungskurven von BM-17-V aus den Grundlagen Basiscreme DAC, HS, WS verlaufen wesentlich flacher. Bei der Freisetzung liegt eine Mischkinetik vor. Die Konzentrationsmenge an freigesetztem BM-17-V aus der Basiscreme DAC erreicht nach 7 Stunden 0,5 µg/cm² und ähnelt damit den Freisetzungsendwerten von BM-17-V aus der Celestan-V® Creme. Die Menge an freigesetztem Wirkstoff aus WS erreicht nach 7 Stunden eine Konzentration von 0,3 µg/cm², welche wegen

des hohen Vaselineanteils doch etwas geringer im Vergleich zu den Freisetzungswerten von BM-17-V aus Soderm® Salbe ist. Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, sind die Flux-Werte von Basiscreme DAC, WS und von den kommerziellen Produkten Soderm® Salbe und Celestan-V® Creme ähnlich. Die Grundlage HS zeigt im Hinblick auf BM-17-V eine deutlich schlechtere Freisetzungsaktivität ($0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 7 Stunden).

In der Arbeit Loth et al. (1979) wurde die Freisetzung der Salicylsäure aus wasserfreien lipophilen Grundlagen des DAB wie Vaseline, WS, HS verglichen. Es wurde festgestellt, dass die Wirkstofflöslichkeit in WS höher als in Vaseline war, entsprechend war auch die Freisetzungsgeschwindigkeit erhöht. Weiterhin wurde in der gleichen Arbeit beschrieben, dass trotz höherer Wirkstofflöslichkeit in HS als in WS die Freisetzungsgeschwindigkeit aus beiden Zubereitungen gleich war.

Für BM-17-V wurde das Gleiche festgestellt. Die Löslichkeit von BM-17-V in HS ist besser als in WS, aber die Freisetzungsgeschwindigkeit ist um den Faktor 1,7 niedriger. BM-17-V zeigt wegen des Emulgierenden Cetylstearylalkohol in HS die bessere Löslichkeit als in der Grundlage WS [Niedner und Ziegenmeyer, 1992]. Der Emulgierende Cetylstearylalkohol ist in Vaseline praktisch nicht löslich und bildet eine eigene Phase, deren kristalline Bereiche unter dem Polarisationsmikroskop zu erkennen sind. Der Emulgierende Cetylstearylalkohol ist ein relativ gutes Lösungsmittel für einige Substanzen, wodurch die Erhöhung der Löslichkeit in der HS zustande kommt. Der in der kristallinen Phase des Emulgierenden Cetylstearylalkohols eingeschlossene Anteil wird jedoch nur sehr langsam freigesetzt. In der äußeren Vaselinephase ist die Sättigungskonzentration dagegen unverändert; dementsprechend weisen Vaseline und HS gleiche Liberationsgeschwindigkeiten auf. In der HS entspricht der Lösungs- und Verteilungszustand einer Solubilisation in festen Mizellen und in WS einer lyotropen Lösungsvermittlung [Loth, 1979]. Der Unterschied der c_s zwischen HS und WS entspricht einem Faktor von 20. Im Freisetzungsverhalten ist der Unterschied nur mit dem Faktor 1,7 feststellbar, da die eingearbeitete Wirkstoffkonzentration von 0,1 % wesentlich höher als die Sättigungskonzentration war.

Die kalkulierten Flux- und Diffusionskoeffizientenwerte für alle Grundlagen werden in Tabelle 5 dargestellt. Der Flux wurde aus dem linearen Abschnitt der Profile ermittelt und der scheinbare Diffusionskoeffizient nach der Gleichung 2 (siehe Kapitel 2.3.6) berechnet. Da die Löslichkeit des Stoffes im Vehikel einen direkten Einfluss auf die Diffusion des Stoffes hat, lassen sich die Ergebnisse mit der unterschiedlichen Sättigungskonzentrationen in den Grundlagen erklären. In gelöster Form steht ein erhöhter Arzneistoffanteil für die Diffusion zur Verfügung.

Die Wasserzugabe zur Grundlage WS führte zur Verbesserung der Löslichkeit des Wirkstoffes in der Grundlage um den Faktor 20 und damit zur Erhöhung der Freisetzung

von BM-17-V aus dem Vehikel. Der Unterschied zwischen den Freisetzungswerten der Grundlagen WS und WWS entspricht einem Faktor von 3,7. Die Grundlagen, in denen der Wirkstoff die höchste Sättigungskonzentration aufweist, zeigen die besseren Freisetzungseigenschaften.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Freisetzung von BM-17-V aus halbfesten Zubereitungen von folgenden Parametern abhängt: Sättigungskonzentration des Wirkstoffes in der Grundlage, Wasseranteil in der Grundlage, Emulgatorstruktur, Emulsionstyp, Struktur der Grundlage.

Tabelle 5: Flux und Diffusionskoeffizient von BM-17-V aus verschiedenen Grundlagen

System	BM-17-V % (m/m)	Flux J [g/(cm ² s)]	D Diffusionskoeffizient
WHS	0,1	$21,73 \times 10^{-11} \pm 4,9 \times 10^{-11}$	$4,91 \times 10^{-17}$
WWS	0,1	$19,32 \times 10^{-11} \pm 3,9 \times 10^{-11}$	$4,31 \times 10^{-17}$
NHC	0,1	$18,83 \times 10^{-11} \pm 3,8 \times 10^{-11}$	$4,09 \times 10^{-17}$
Soderm® Salbe	0,1	$8,19 \times 10^{-11} \pm 1,1 \times 10^{-11}$	$1,38 \times 10^{-16}$
Basiscreme DAC	0,1	$6,13 \times 10^{-11} \pm 0,6 \times 10^{-11}$	$3,91 \times 10^{-18}$
Celestan® Creme	0,1	$5,78 \times 10^{-11} \pm 2,5 \times 10^{-11}$	$3,47 \times 10^{-18}$
WS	0,1	$5,17 \times 10^{-11} \pm 1,4 \times 10^{-11}$	$5,50 \times 10^{-17}$
Celestan® Salbe	0,1	$1,26 \times 10^{-11} \pm 0,5 \times 10^{-11}$	$1,65 \times 10^{-19}$
HS	0,1	$2,95 \times 10^{-11} \pm 0,2 \times 10^{-11}$	$9,04 \times 10^{-19}$

4.3. Permeationsuntersuchungen von BM-17-V durch exzidiertes humanes Stratum corneum

4.3.1. Permeation von BM-17-V aus den Fertigarzneimitteln: Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe, Soderm® Salbe

Da sich während der Untersuchung das Hydrolyseprodukt bildete, wird in Abbildung 22 der Permeationsverlauf von BM durch exzidiertes Stratum corneum aus den kommerziellen Produkten Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe und Soderm® Salbe im Vergleich dargestellt. Wie aus der Grafik ersichtlich ist, unterscheiden sich die Permeationkurven kaum voneinander. Die Menge an permeiertem BM aus Soderm® Salbe und Celestan-V® Salbe

erreicht nach ca. 27 Stunden $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Celestan-V® Creme zeigt eine geringere BM-Permeabilität ($0,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach ca. 27 Stunden). Der Flux, der im linearen Bereich der Graphen aus der Steigung ermittelt wird, ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Fluxwerte weisen genauso wie bei den bereits untersuchten Hydrokortison Fertigarzneimitteln [Refai und Müller-Goymann, 2002] keine deutlichen Unterschiede auf.

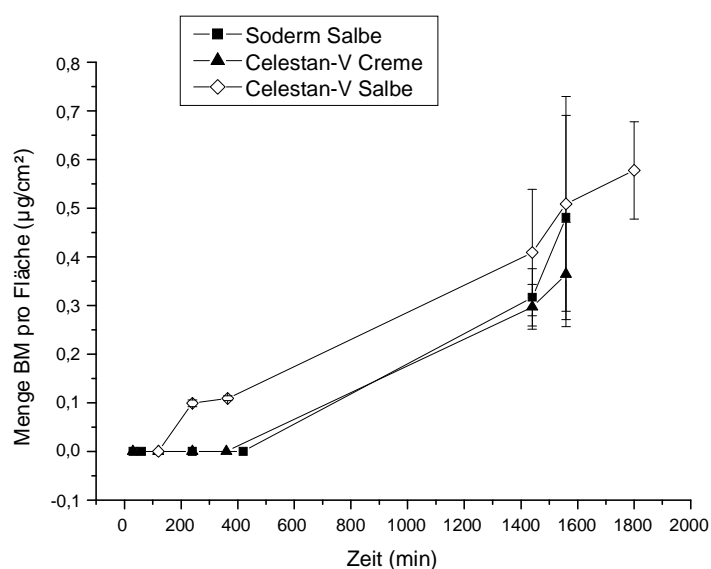


Abbildung 22: Permeation von BM durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus BM-17-V-haltigen Fertigarzneimitteln: Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe, Soderm® Salbe; Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre, n=4-6

Tabelle 6: Arzneistoffflux für die Permeation von BM aus Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe und Soderm® Salbe durch exzidiertes Stratum corneum. Spender (W/69J./Abdomen), Mittelwert \pm SD (n=6)

Grundlage	Flux J [g/(cm²'s)] Faktor 1×10^{-12}
Soderm® Salbe	$4,92 \pm 1,6$
Celestan-V® Salbe	$5,35 \pm 2,6$
Celestan-V® Creme	$4,05 \pm 0,9$

4.3.2 Permeation von BM-17-V aus Grundlagen des DAB

Abbildung 23 stellt die Permeations-Zeit-Profile von BM aus 0,1 % BM-17-V-haltigen Systemen WS, WHS, WWS, HS, NHC, Basiscreme DAC im Vergleich dar. Wie in dieser Abbildung

dargestellt ist, verläuft die Permeation von BM aus den verschiedenen Formulierungen unterschiedlich. Am Besten erfolgt die Permeation von BM aus 0,1 % WS (0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach ca. 30 Stunden Untersuchungszeitraum), die gleiche Permeationsrate zeigen Soderm® Salbe und Celestan-V® Salbe (Abbildung 22). Die Permeationskurven von BM aus 0,1 % WHS und 0,1 % Basiscreme DAC verlaufen flacher, die gesamte Menge an permeiertem BM erreichte nach ca. 30 Stunden 0,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und entspricht der Permeation von BM aus Celestan-V® Creme. Die geringste Permeation erfolgt aus den Zubereitungen 0,1 % HS, 0,1 % WWS, 0,1 % NHC. Die Permeation von BM aus diesen Formulierungen ist nicht nachweisbar oder die permeierte Wirkstoffmenge liegt unter der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik, obwohl in diesen Grundlagen die Sättigungskonzentration von BM-17-V um das 20-fache höher als in der Grundlage WS (Tabelle 4) ist und die Liberation aus den Grundlagen auch wesentlich höher als bei WS und Basiscreme DAC (Abbildung 21) ist. Vermutlich wird der Wirkstoff im SC gespeichert oder es ist zu einer Rückdiffusion in die Grundlage gekommen.

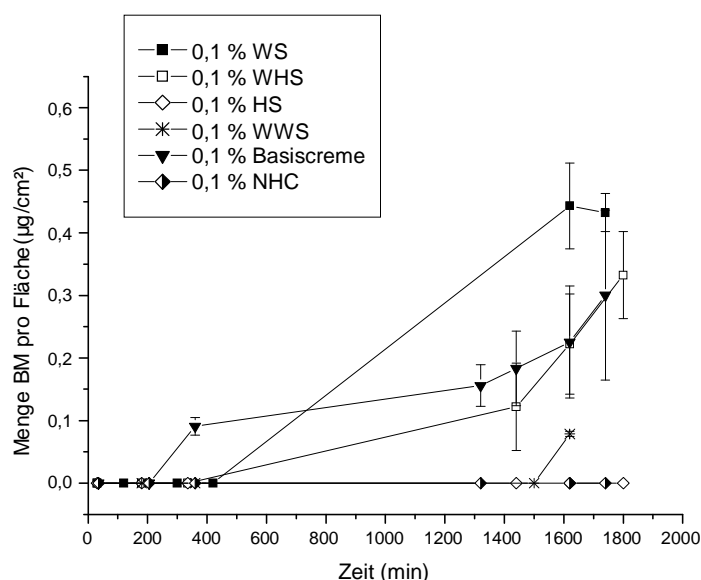


Abbildung 23: Permeation von BM durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus BM-17-V haltigen Systemen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,1 %: WS, WHS, HS, WWS, Basiscreme DAC; Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre, n=4-6

Der Diffusionswiderstand der Hornschicht ist sehr hoch und die darunter liegenden Hautschichten haben nur für eine kurze Zeit nach dem Auftragen der Formulierung die Eigenschaften eines „perfect sink“. Die geringere Durchlässigkeit des SC für die meisten Arzneistoffe führt zu deren starker Anreicherung in der Hornschicht; dies wiederum hat zur Folge, dass der Konzentrationsgradient in der Salbe kleiner wird, weil das Verhältnis der Konzentrationen in den aneinander angrenzenden Schichten des SC und der Zubereitung

durch den Verteilungskoeffizienten bestimmt ist. Bei den Salben mit hoher Liberationsgeschwindigkeit erfolgen der Anstieg der Arzneistoffkonzentration in der Hornschicht und die sich daraus rückwirkend ergebende Abflachung des Konzentrationsgradienten in der Salbe schneller als bei den langsam freisetzenden Salben. [Loth, 1982]

Der Permeationskoeffizient P , der sich aus dem Flux durch Division durch die Sättigungskonzentration entsprechend Gleichung 6 (siehe Kapitel 3.2.10.) berechnen lässt, ist Tabelle 7 zu entnehmen. Die Fluxdaten aus WS, WHS und Basiscreme DAC unterscheiden sich nicht signifikant. Allerdings ist der Permeationskoeffizient der Grundlage WS um das 11-fache höher.

Die Zubereitungen WS und Basiscreme DAC wurden in weiteren Permeationsuntersuchungen zu anderen Fragestellungen häufig als Vergleich mit untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Basiscreme DAC eine höhere Permeabilität im Vergleich zu WS zeigt. Insofern ist das Fazit einer Überlegenheit von WS gegenüber Basiscreme DAC auf der Basis der ersten Permeationsstudie kritisch zu sehen, insbesondere weil im Zeitraum von 420 bis 1600 min keine Probenahmen erfolgten und nicht beurteilt werden kann, ob der starke Konzentrationsanstieg im Akzeptorkompartiment entsprechend Abbildung 23 womöglich auf eine Beschädigung des Stratum corneum zurückzuführen sein könnte.

Tabelle 7: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizienten für die Permeation von BM aus 0,1 % BM-17-V-Formulierungen durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre (n=5-6), $p^* < 0,05$

Grundlage	Flux J [g/(cm ² 's)]	Permeationskoeffizient [cm/s]
WS	$4,82 \times 10^{-12}$ $\pm 3,8 \times 10^{-13}$	$9,5 \times 10^{-9}$ $\pm 8,5 \times 10^{-10}$
WHS	$3,44 \times 10^{-12}$ $\pm 8,2 \times 10^{-13}$	$3,43 \times 10^{-10}$ $\pm 8,2 \times 10^{-11}$
Basiscreme DAC	$2,52 \times 10^{-12}$ $\pm 9,8 \times 10^{-13}$	$2,52 \times 10^{-10}$ $\pm 9,8 \times 10^{-11}$
WWS*	$9,55 \times 10^{-13}$ $\pm 5,0 \times 10^{-14}$	$1,06 \times 10^{-10}$ $\pm 5,5 \times 10^{-12}$

4.3.3. Permeation von Betamethason, Betamethason-17-valerat und Prednisolon aus Basiscreme DAC im Vergleich

In diesem Versuch wurden die lipophilen Eigenschaften von drei unterschiedlichen Glukokortikoiden, BM-17-V, BM und PD, hinsichtlich des Permeationsverhaltens durch SC verglichen. Alle Wirkstoffe wurden in einer Konzentration von 0,1 % (m/m) in Basiscreme DAC eingesetzt. Abbildung 24 zeigt den Permeationsverlauf von BM aus der BM-17-V- und BM-haltigen Formulierung im Vergleich. Aus der BM-17-V-haltigen Formulierung permeierte nur das Hydrolyseprodukt BM, der Arzneistoff selbst konnte im Akzeptor nicht detektierbar werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die erreichte Menge an permeiertem BM aus der BM-17-V-haltigen Formulierung nach 30 Stunden die Konzentration $1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht. Die permeierte Menge an BM aus der BM-haltigen Formulierung erreichte zum gleichen Zeitpunkt nur die Hälfte ($0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Anhand dieser Ergebnisse ist es vorteilhafter BM-17-V als Prodrug einzusetzen, das eine höhere Lipophilie als BM und so bessere Penetrationseigenschaften aufweist. Als Faustregel gilt: am Besten dringen ambiphile Substanzen mit leichtem Überwiegen der Lipophilie in die Haut ein. So ist z.B. die systemische Wirksamkeit von Triamcinolon und Triamcinolonacetonid ähnlich, lokal kommt es jedoch zu einer deutlichen Wirkungsverstärkung von Triamcinolonacetonid sowie beim Hydrokortison-17-butytrat erhöht sich der Influx durch Veresterung der OH-Gruppe in 17-Stellung [Korting et al., 2005].

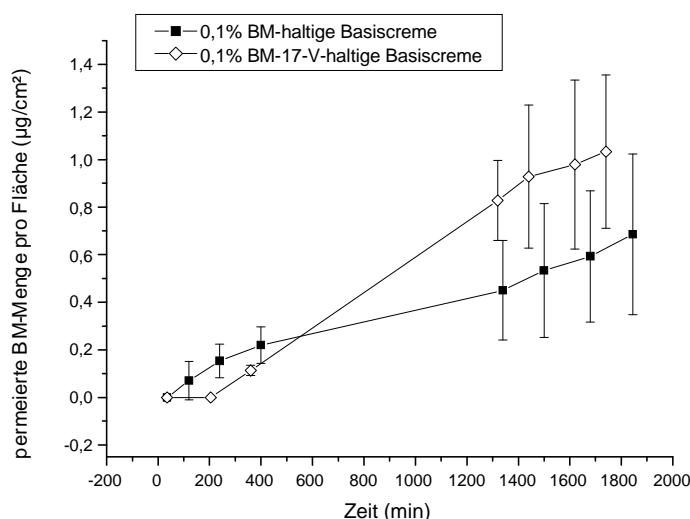


Abbildung 24: Permeation von BM durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus 0,1 % BM- und 0,1 % BM-17-V-haltigen Systemen, Spender : weiblich, Abdomen, 69 Jahre, n=4-6

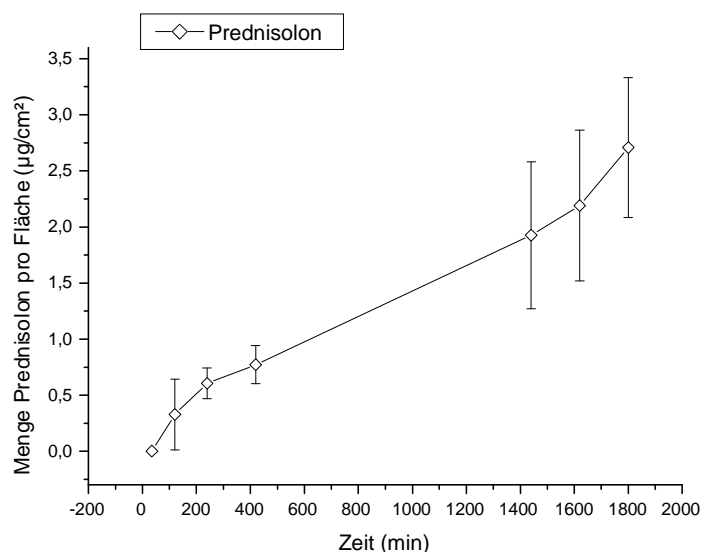


Abbildung 25: Permeation von PD aus Basiscreme DAC, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre, n=4-6

In Abbildung 25 ist der Permeationsverlauf von PD aus Basiscreme DAC dargestellt. Die Menge an PD aus der Basiscreme erreicht nach 30 Stunden 2,8 µg/cm² und ist damit um das 3-fache höher als die permeierte BM-Menge aus der BM-17-V-haltigen Formulierung.

PD permeierte in einem 3-fach höheren Anteil als BM-17-V und in einem 6-fach höheren Anteil als BM. In Bezug auf die antiinflammatorische Wirkung bleibt Prednisolon jedoch gegenüber BM-17-V wesentlich zurück (Wirkungsstärke 4 gegenüber 30).

4.3.4. Einfluss der Verdünnung von BM-17-V-haltigen Zubereitungen auf das Permeationsverhalten des Wirkstoffs

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Verdünnung kortikoidhaltiger halbfester Zubereitungen zu keiner Permeationsreduzierung führt [Refai, 2001]. Um zu überprüfen, ob dies auch für BM-17-V gilt, wurden 0,1 % BM-17-V in WS und Basiscreme DAC eingearbeitet und diese Zubereitungen mit unterschiedlichen DAB-Grundlagen verdünnt und miteinander verglichen. Ebenso wurde mit dem Fertigarzneimittel Soderm® Salbe verfahren.

4.3.4.1. Permeation von BM-17-V aus Soderm® Salbe und ihren Verdünnungen

Abbildung 26 zeigt den Permeationsverlauf von BM aus Soderm® Salbe, WS mit 0,1% BM-17-V, einer Mischung von Soderm® Salbe mit 0,1% BM-17-V-haltiger WS (1:1) (m/m) und einer Verdünnung von Soderm® Salbe mit reiner WS-Grundlage (1:1) (w/w) durch das SC im Vergleich. Die Permeationskurven von BM aus allen Zubereitungen unterscheiden sich kaum von einander. Auch die Berechnung von Flux und Permeationskoeffizienten für die Zubereitungen Soderm® Salbe und WS zeigt keinen deutlichen Unterschied, vermutlich weil beide Zubereitungen eine ähnliche Zusammensetzung haben (Tabelle 8). Die Verdünnung der 0,1 %-igen BM-17-V Formulierung Soderm® Salbe mit WS im Verhältnis 1:1 führte zu keiner Reduzierung der Wirkstoffpermeation. Dieses Phänomen wurde in der Literatur bereits für Hydrokortison beschrieben [Refai und Müller-Goymann, 1999]. Solange die Sättigungskonzentration des Wirkstoffes in der Grundlage und im SC nicht überschritten wird, resultiert das gleiche Permeations- und Freisetzungsverhalten.

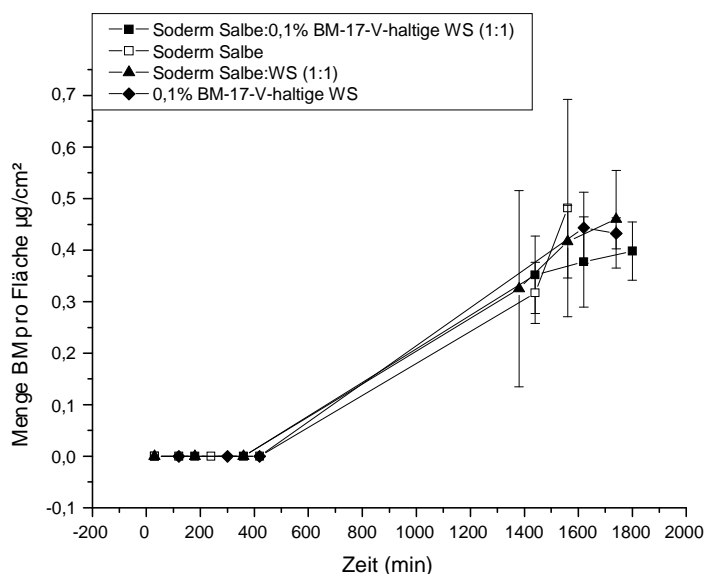


Abbildung 26: Permeation von BM durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus den BM-17-V-haltigen Systemen Soderm® Salbe, WS, der Mischung Soderm® Salbe und 0,1% BM-17-V-haltiger WS (1:1) (m/m) und der Verdünnung Soderm® Salbe mit wirkstofffreier WS (1:1). Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre, n=4-6

Tabelle 8: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizienten für die Permeation von BM aus Soderm® Salbe, WS, einer Mischung aus Soderm® Salbe mit 0,1 % BM-17-V-haltiger WS (1:1) (m/m) und aus der Verdünnung Soderm® Salbe mit wirkstofffreier WS (1:1) durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre (n=5-6)

Grundlage	Flux J [g/(cm ² s)]	Permeationskoeffizient [cm/s]
Soderm® Salbe	$4,92 \times 10^{-12}$ $\pm 7,3 \times 10^{-13}$	$9,76 \times 10^{-9}$ $\pm 1,9 \times 10^{-9}$
0,1 % BM-17-V-haltige WS	$4,82 \times 10^{-12}$ $\pm 4,3 \times 10^{-13}$	$9,5 \times 10^{-9}$ $\pm 8,5 \times 10^{-10}$
Soderm Salbe : 0,1 % BM-17-V-haltige WS (1:1)	$3,71 \times 10^{-12}$ $\pm 8,1 \times 10^{-13}$	$7,35 \times 10^{-9}$ $\pm 1,6 \times 10^{-9}$
Soderm Salbe : wirkstofffreie WS (1:1)	$4,92 \times 10^{-12}$ $\pm 9,1 \times 10^{-13}$	$9,76 \times 10^{-9}$ $\pm 1,8 \times 10^{-9}$

4.3.4.2. Permeation von BM-17-V aus 0,1 % WS und ihren Verdünnungen mit unterschiedlichen DAB-Grundlagen

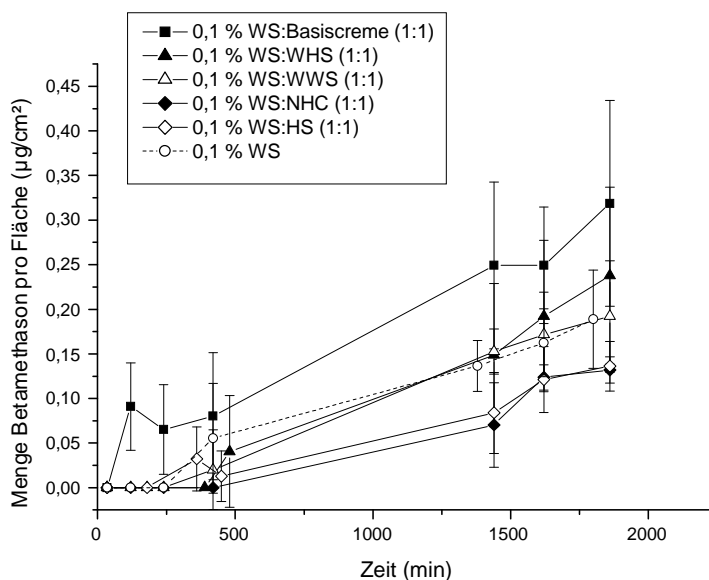


Abbildung 27: Permeation von BM durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus BM-17-V -haltigen Systemen 0,1% WS und ihren Verdünnungen mit verschiedenen Grundlagen DAB (1:1) (w/w); Spender: weiblich, Abdomen, 63 Jahre, n=4-6

Abbildung 27 zeigt den Permeationsverlauf von BM aus der 0,1%-igen BM-17-V-haltigen WS und ihren Verdünnungen mit verschiedenen DAB Grundlagen im Verhältnis (1:1) (m/m) durch das SC im Vergleich. Die Permeationskurven von BM aus allen Zubereitungen unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Es ist wieder zu erkennen, dass eine Reduzierung des Wirkstoffes um die Hälfte zu keiner Reduzierung der Wirkstoffpermeation durch das SC führt. Die Veränderung der Zusammensetzung der Grundlage sowie die Erhöhung des Wasseranteils auf 35 % bezogen auf die gesamte Formulierung (die Mischung mit WHS 1:1) verbessern die Löslichkeit des Wirkstoffes im Vergleich zur reinen Grundlage WS um den Faktor 21 (Tabelle 9), es sind aber keine entsprechenden Unterschiede in der Permeationsgeschwindigkeit festzustellen (Tabelle 10). Das Ersetzen eines Teils der WS durch HS und NHC verbessert die Löslichkeit von BM-17-V um den Faktor 3,6 und 6,3 (Tabelle 9), führt aber zu einer leichten Reduzierung der Permeation. Wie aus Tabelle 10 zu entnehmen ist, zeigt die Verdünnung der 0,1 % WS mit Basiscreme DAC die höchsten Werte für Flux und Permeationskoeffizienten. Der Flux im Vergleich zur Stammrezeptur 0,1 % WS entspricht einem Faktor von 2,5, der Permeationskoeffizient ist um das 17-fache höher als bei den anderen Formulierungen. Das Ersetzen eines Teils der WS durch Basiscreme verbessert die Löslichkeit von BM-17-V um den Faktor 5,1 (Tabelle 9). Eine Verbesserung der Permeation könnte aber nicht nur an der verbesserten Sättigungslöslichkeit liegen. Für die Liberationsgeschwindigkeit spielen außerdem rheologische und gute Spreitungseigenschaften der Zubereitung eine gewisse Rolle. Aus diesem Grund wurden die 0,1% BM-17-V-haltige WS sowie ihre 1:1 Verdünnungen auf ihre rheologischen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind Abbildung 28 zu entnehmen.

Tabelle 9: Sättigungskonzentration von BM-17-V in WS und unterschiedlichen (1:1) Formulierungen bei 20°C

Grundlage	Sättigungskonzentration C (% m/m)	Quotient $\frac{c_{sZubereitung}}{c_{sWS}}$
WS	0,000505	1
WS : WS	0,000505	1
WS : WHS	0,011	21,7
WS : WWS	0,0032	6,3
WS : NHC	0,0032	6,3
WS : Basiscreme DAC	0,0026	5,1
WS : HS	0,0018	3,6

Tabelle 10: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizienten für die Permeation von BM aus 0,1% BM-17-V-haltiger WS und ihren Verdünnungen, verdünnt mit den anderen DAB-Grundlagen (1:1)(w/w) durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 63 Jahre (n=5-6)

Grundlage	Flux J [g/(cm ² 's)]	Permeationskoeffizient [cm/s]
0,1% WS	$1,93 \times 10^{-12}$ $\pm 6,7 \times 10^{-12}$	$3,8 \times 10^{-9}$ $\pm 1,4 \times 10^{-10}$
0,1% WS: Basiscreme (1:1)	$2,6 \times 10^{-12}$ $\pm 1,4 \times 10^{-12}$	$10,0 \times 10^{-9}$ $\pm 5,3 \times 10^{-10}$
0,1% WS: WS (1:1)	$1,8 \times 10^{-12}$ $\pm 4,06 \times 10^{-13}$	$3,5 \times 10^{-9}$ $\pm 8,8 \times 10^{-10}$
0,1% WS: HS (1:1)	$1,28 \times 10^{-12}$ $\pm 2,26 \times 10^{-13}$	$7,1 \times 10^{-10}$ $\pm 1,4 \times 10^{-10}$
0,1% WS: WWS (1:1)	$1,91 \times 10^{-12}$ $\pm 5,2 \times 10^{-13}$	$5,9 \times 10^{-10}$ $\pm 1,6 \times 10^{-10}$
0,1% WS: NHC (1:1)	$1,26 \times 10^{-12}$ $\pm 8,06 \times 10^{-14}$	$3,9 \times 10^{-10}$ $\pm 2,9 \times 10^{-11}$
0,1% WS: WHS (1:1)	$2,22 \times 10^{-12}$ $\pm 8,0 \times 10^{-13}$	$2,0 \times 10^{-10}$ $\pm 7,9 \times 10^{-11}$

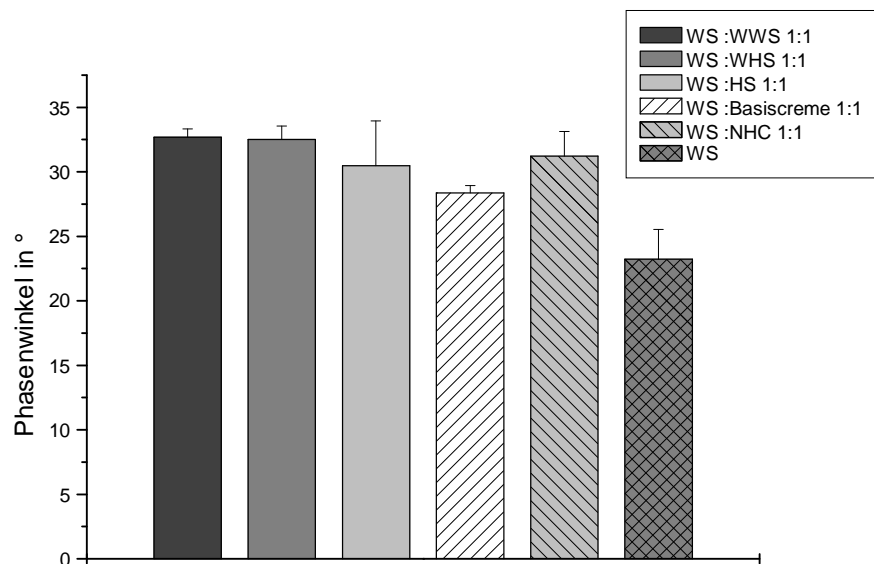


Abbildung 28: Phasenwinkel der Grundlage 0,1% BM-17-V enthaltende WS und ihrer Verdünnungen (1:1) mit WWS, WHS, HS, Basiscreme, NHC

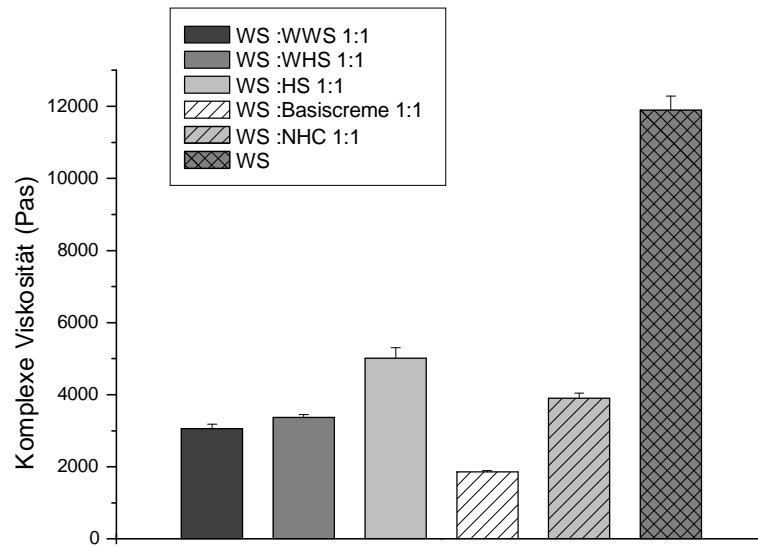


Abbildung 29: Komplexe Viskosität der Grundlage 0,1% BM-17-V enthaltende WS und ihrer Verdünnungen (1:1) mit WWS, WHS, HS, Basiscreme, NHC

Tabelle 11: Elastischer Modul G' und viskoser Modul G'' der 0,1% BM-17-V enthaltenden Arzneibuchgrundlage WS und ihrer Verdünnungen mit unterschiedlichen Grundlagen DAB

Grundlage	Elastischer Modul G' (Pa)	Viskoser Modul G'' (Pa)
WS	343.294 ± 13.703	147.078 ± 13.762
WS : NHC (1 :1)	104.629 ± 4.446	63.382 ± 4.160
WS :Basiscreme (1:1)	51.329 ± 1.075	27.728 ± 653
WS : HS (1:1)	135.699 ± 9.318	79.799 ± 9.003
WS : WHS (1:1)	89.275 ± 2.055	56.901 ± 2.357
WS : WWS (1:1)	80.843 ± 3.614	51.836 ± 1.608

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich ist, sind der elastische und viskose Modul der Verdünnung 0,1% BM-17-V-haltiger WS : Basiscreme (1:1) die kleinsten von allen Formulierungen. Auch die komplexe Viskosität dieser Zubereitung ist am geringsten, was eine erleichterte Freisetzung für den Wirkstoff erklären könnte (Abbildung 29).

Die komplexe Viskosität ist bei wirkstoffhaltiger WS am höchsten, für die 1:1 Verdünnung mit Basiscreme am geringsten (Abbildung 29). Mit zunehmendem Wasseranteil nimmt die Fließfähigkeit zu. Die Mischung der WS mit den wasserhaltigen Grundlagen erhöht den Phasenwinkel und somit den viskosen Anteil, während die komplexe Viskosität herabgesetzt wird.

4.3.5. Zusammenfassende Diskussion über das Permeationsverhalten von BM-17-V aus Cremen und Salben sowie aus ihren Verdünnungen durch exzidiertes Stratum corneum

Die Wirkstoffpermeation durch Stratum corneum aus den beschriebenen halbfesten Zubereitungen sowie aus deren Verdünnungen ist von der Intaktheit der Struktur des Stratum corneum und von dessen Sättigung mit dem Arzneistoff abhängig. In Abhängigkeit von der eingesetzten Formulierung, ob Suspensions- oder Lösungssystem, können die Verdünnungen der halbfesten Zubereitungen zu einer Reduzierung, keiner Veränderung oder einer Erhöhung der Permeation im Vergleich zu den Stammzubereitungen führen. Handelt es sich bei der Stammformulierung um eine Suspensionszubereitung, wird diese mit einer Grundlage verdünnt. Wenn dabei der Suspensionstyp beibehalten wird, wird dabei keine Veränderung der Permeabilität festgestellt. Resultiert jedoch eine Lösungssalbe, wird der betreffende Wirkstoff im Vehikel besser gelöst, seine Liberation aus der Grundlage durch eine Veränderung des Verteilungskoeffizienten behindert und die Permeabilität für BM-17-V reduziert. Wenn aber die zur Verdünnung angewendete Grundlage zusätzlich einen Penetrationsförderer enthalten sollte, könnte die Verdünnung eine Erhöhung der Permeabilität zur Folge haben.

Der Okklusionseffekt, den die untersuchten Zubereitungen bewirken können, muss berücksichtigt werden. Die Applikation einer Salbe auf der Haut reduziert die Wasserverdunstung von der Hautoberfläche, wobei gleichzeitig die Hauthydratation erhöht wird. Darüber hinaus erfolgt eine Zunahme der Permeabilität. Die Applikation einer Creme oder Lotion führt zu keiner Abdeckung der oberen Hautschicht. Es kommt zu keiner Zunahme des Wassergehaltes im Stratum corneum, weil ein ständiger Gas- und Wasser-Austausch zwischen Haut und Atmosphäre erfolgt. Deswegen kann der Austausch einiger Bestandteile in der halbfesten Zubereitung gegen okklusiv wirkende Bestandteile möglicherweise eine Permeation fördern.

Die oben beschriebenen Faktoren gelten natürlich nur für die unverletzte Haut. Im Fall ihrer Schädigung kann es zu ganz anderen Ergebnissen kommen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkstofffreisetzung aus dem Vehikel von der Zusammensetzung, dem Wasseranteil, der Viskosität der Zubereitung nach Verdünnung abhängig ist.

BM-17-V wurde in der zur Aufnahme von Wasser befähigten Absorptionsgrundlage WS in einer Konzentration von 0,1 % (m/m) eingearbeitet. WS wurde im Verhältnis (1:1) mit allen Arzneibuchgrundlagen verdünnt. Je nach Affinität des Wirkstoffes zu der jeweiligen Verdünnungsgrundlage variierte die Sättigungskonzentration des Arzneistoffes von 0,0005 % bis zu 0,02 % (Tabelle 9). Die Erhöhung der Sättigungskonzentration des Wirkstoffs in der Zubereitung nach der Verdünnung mit Creme Grundlagen, die zum O/W-Typ gehören, ging nicht mit einer entsprechenden Erhöhung der Permeationsgeschwindigkeit des Arzneistoffes aus der resultierenden Formulierung einher. Eine Reduzierung der Wirkstoffkonzentration auf die Hälfte sowie der Austausch eines Teils der Grundlage WS gegen eine wasserfreie bzw. wasserhaltige Grundlage mit Ausnahme von Basiscreme DAC führte zu keiner Reduzierung der Arzneistoffpermeation. Die Erhöhung der Wirkstofflöslichkeit in der Grundlage zeigte keinen Effekt auf die Permeationsrate, weil die BM-17-V-Sättigungskonzentration in den Grundlagen niedriger als die eingearbeitete Konzentration blieb. Die Permeationsuntersuchungen haben gezeigt, dass die Permeationsgeschwindigkeit des Wirkstoffes von den rheologischen Eigenschaften der Formulierungen mit Ausnahme einer Verdünnung mit Basiscreme DAC unabhängig war. Jedoch könnten die niedrigeren Werte des elastischen und viskosen Moduls, wie z.B. bei der Verdünnung WS mit der Basiscreme DAC zu sehen in Tabelle 11 einen leichten Anstieg der Wirkstoffpermeation verursachen (Abbildung 27).

4.4. Einfluss von Isopropylalkohol (IPA) und Isopropylmyristat (IPM) auf die Penetration von BM-17-V aus dermalen Zubereitungen und deren Einfluss auf die Stratum corneum Struktur

Synergistische Effekte von IPA und IPM in Kombination mit dermalen Zubereitungen sind bereits publiziert worden. Alberg (1998) untersuchte das Fertigarzneimittel Soventol® HC Creme (Dr. Rentschler Arzneimittel GmbH & Co., D-Laupheim) hinsichtlich des Permeationsverhaltens von Hydrokortisonacetat. Trotz eines geringeren Hydrokortisonacetat-Gehalts und dank eines Zusatzes von IPM und IPA wies die Grundlage eine vergleichsweise hohe Permeationsaktivität auf. In einer späteren Studie hat Refai und Müller-Goymann (2002) diese Grundlage im Hinblick auf Hydrokortison untersucht und die gleichen Zusammenhänge gefunden. Es wurde die Hypothese angenommen, dass die in der

Soventol®-Grundlage enthaltenen Hilfsstoffe Isopropylmyristat und Isopropylalkohol einen Effekt auf die SC -Barriereeigenschaft ausüben könnten. Brinkmann und Müller-Goymann (2003) haben in ihrer Arbeit einen Effekt von IPA und IPM hinsichtlich des Permeationsverhaltens von Hydrokortison aus WHS und deren Effekt auf die Mikrostruktur des SC untersucht, in einer weiteren Arbeit [Brinkmann und Müller-Goymann, 2005] hat sie dieses am Beispiel von Prednicarbat vertieft. In der vorliegenden Arbeit wird die kombinierte Wirkung des Alkohols mit dem flüssigen Ester hinsichtlich des Permeationsverhaltens eines weiteren Vertreters der Glukokortikoidgruppe, das BM-17-V, aus WS und Basiscreme DAC untersucht. Außerdem wird eine differenzkalorimetrische Analyse der Struktur des SC nach der Behandlung mit den Enhancern vorgestellt.

4.4.1. Permeation von BM-17-V aus Wollwachsalkoholsalbe mit und ohne Zusatz von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat

In Abbildung 30 sind die Permeationskurven von BM aus der 0,1 %-igen BM-17-V-haltigen WS sowie mit und ohne Zusatz der Penetrationenhancer IPA und IPM im Vergleich dargestellt. In allen Permeationsgraphen wird die permeierte Menge des Hydrolyseprodukts (BM) gegen die Zeit aufgetragen. Laut Tabelle 12 beträgt der Flux für BM aus der Zubereitung WS ohne Enhancerzusatz $3,16 \times 10^{-12} \text{ [g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$, während der Flux für die gleiche Grundlage mit IPM oder IPA Zusatz entsprechend $6,28 \times 10^{-13}$ bzw. $23,17 \times 10^{-12} \text{ [g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$ beträgt. Die Grundlage WS mit einer Kombination von IPA und IPM zeigt den höchsten Fluxwert $38,0 \times 10^{-12} \text{ [g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$. Das als Verhältnis des BM-Fluxes aus der Grundlage mit Enhancer zu dem BM-Flux aus der Grundlage ohne Enhancer macht deutlich um welchen Faktor die Permeation verbessert bzw. verschlechtert wird durch den Zusatz. Die Zugabe von IPA zur Formulierung WS verbessert die Wirkstoffpermeation um den Faktor 7,3, der Quotient bei Zugabe von IPM zur Grundlage beträgt 0,2, d.h. die Permeation ist 5-fach schlechter. Eine Kombination von beiden Hilfsstoffen erhöht jedoch die Permeation für BM um das 12-fache (Abbildung 30).

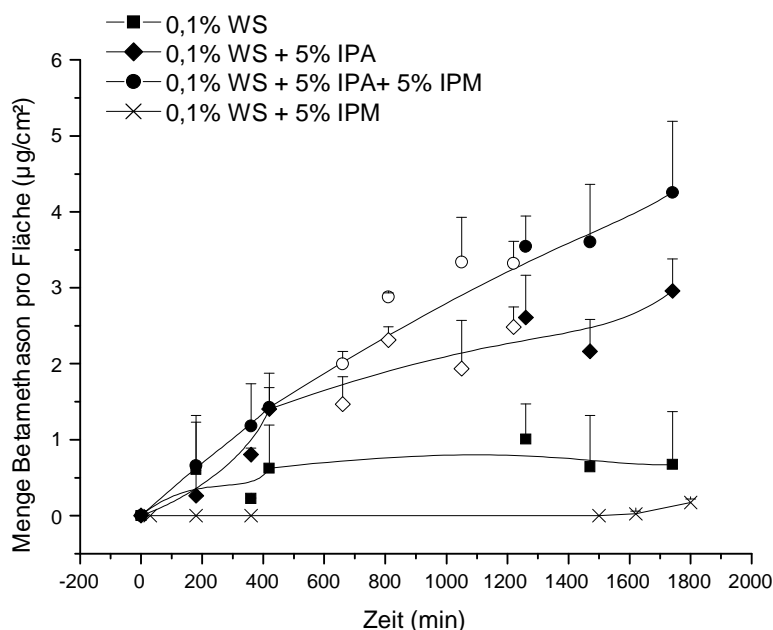


Abbildung 30: Permeation von BM durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus 0,1% BM-17-V haltigen Systemen WS mit und ohne IPA und IPM; Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre, n=4-6.

Die graphische Darstellung besteht aus zwei Experimenten (über 30 Stunden und über 12 Stunden), um die zusätzlichen Punkte in der Nachtphase zu bestimmen.

In Hinblick auf die BM-17-V Sättigungskonzentration (Tabelle 13) resultiert bei Zugabe von IPA die beste Wirkstofflöslichkeit in der Formulierung (0,1 % (m/m)). Bei der mikroskopischen Untersuchung waren keine Wirkstoffkristalle mehr detektierbar. Laut dem Quotient, der aus der gleichen Tabelle zu entnehmen ist, war die Cs für BM-17-V um das 37-fache höher im Vergleich zu der Grundlage ohne IPA-Zugabe. Wie in der gleichen Tabelle dargestellt wird, war Cs nach der Zugabe von IPM $2,38 \times 10^{-3}$ (% m/m). Da dieser Wert fast dem Cs Wert von WS entspricht, verblieb der Cs-Quotient entsprechend fast unverändert. Letztendlich lag der Cs Wert nach der Zugabe der Kombination von IPA und IPM bei $5,0 \times 10^{-2}$ (% m/m), entsprechend einem Cs-Quotienten von 18,5. Insgesamt ist der Cs-Quotient für die Mischung IPA und IPM deutlich niedriger als für IPA alleine, aber wesentlich höher als für IPM. Daraus folgt, dass zusätzliches IPM die Löslichkeit von BM-17-V in der Mischung reduziert.

Tabelle 12: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizienten für die Permeation von BM aus 0,1% BM-17-V WS mit einer Kombination von IPA und IPM durch exzidiertes Stratum corneum. Spender (W/69J./Abdomen (n=4-6), *p<0,05 für die Formulierung WS mit unterschiedlichen Enhancern verglichen mit WS ohne Enhancer.

Grundlage	Betamethason Flux J [g · cm ⁻² · s ⁻¹]	Quotient $\frac{J_{WS+Enhancer}}{J_{WS}}$	Permeations- koeffizient [cm/s]
WS	$3,16 \times 10^{-12} \pm 3,8 \times 10^{-13}$	1	$1,17 \times 10^{-9} \pm 1,4 \times 10^{-10}$
WS + IPA*	$23,17 \times 10^{-12} \pm 2,6 \times 10^{-12}$	7,3	$2,32 \times 10^{-10} \pm 2,6 \times 10^{-11}$
WS + IPM*	$6,28 \times 10^{-13} \pm 1,1 \times 10^{-14}$	0,2	$2,64 \times 10^{-10} \pm 4,6 \times 10^{-11}$
WS + IPA-IPM* 1:1 (w/w)	$38,0 \times 10^{-12} \pm 2,4 \times 10^{-13}$	12,0	$7,6 \times 10^{-10} \pm 4,8 \times 10^{-12}$

Tabelle 13: Sättigungskonzentration von BM-17-V in verschiedenen Formulierungen bei 20°C

Grundlage	Sättigungskonzentration c _s von BM-17-V (% w/w)	Quotient $\frac{c_{sZubereitung}}{c_{sWS}}$
WS	$2,70 \times 10^{-3}$	1
WS + IPA	1×10^{-1}	37,0
WS + IPM	$2,38 \times 10^{-3}$	0,8
WS + IPA-IPM 1:1 (w/w)	$5,0 \times 10^{-2}$	18,5

4.4.2. Permeation von BM-17-V aus Basiscreme DAC mit und ohne Zusatz von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat

Da sich während der Untersuchung nicht nur das Hydrolyseprodukt bildete, sondern ein weiterer Abbau von BM in 9α-Fluorprednisolon erfolgte, wird in Abbildung 31 der Permeationskurvenverlauf von allen Metaboliten aus Basiscreme DAC mit und ohne Kombination der Enhancer IPA und IPM durch exzidiertes humanes Stratum corneum im Vergleich dargestellt, berechnet als BM.

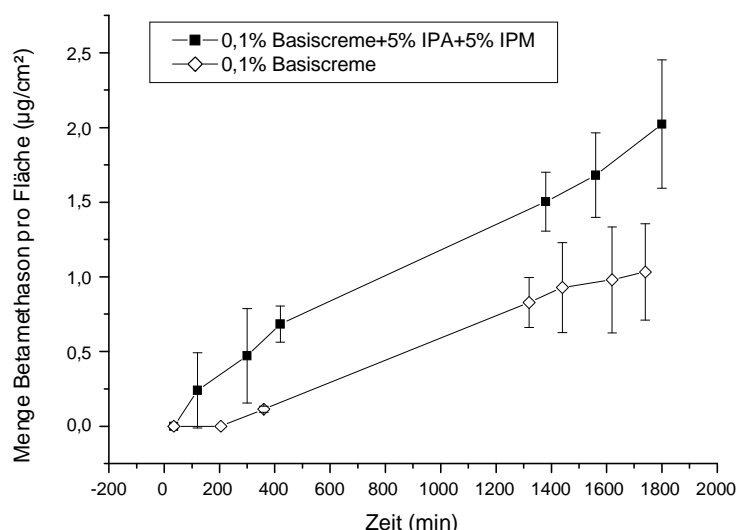


Abbildung 31: Permeation der summierten BM, BM-17-V, 9 α -Fluor-PD Menge durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus BM-17-V-haltigen Systemen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,1 % in Basiscreme mit und ohne IPA und IPM; Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre, n=4-6

Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, begünstigt eine Kombination von IPA und IPM in Basiscreme den Flux für BM. Betrachtet man den Quotienten, ist der Flux für BM aus der Basiscreme nach Enhancerzugabe um das 2-fache größer als aus der Creme ohne Enhancerzusatz.

Tabelle 14: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizienten für die Wirkstoff Permeation aus 0,1% BMV in Basiscreme mit und ohne IPA und IPM durch exzidiertes Stratum corneum (berechnet als Betamethason). Spender (W/69J./Abdomen (n=4-6), *p<0,05 Basiscreme DAC + 5% IPA + 5% IPM verglichen mit der Basiscreme DAC

Grundlage	Betamethason Flux J [g · cm ⁻² · s ⁻¹]	Quotient $\frac{J_{WS+Enhancer}}{J_{WS}}$	Permeationskoeffizient [cm/s]
Basiscreme DAC	$1,12 \times 10^{-11} \pm 1,3 \times 10^{-12}$	1	$1,12 \times 10^{-9} \pm 3,3 \times 10^{-10}$
Basiscreme DAC + 5% IPA + 5% IPM*	$2,07 \times 10^{-11} \pm 3,2 \times 10^{-12}$	1,8	$4,14 \times 10^{-10} \pm 1,7 \times 10^{-10}$

Im Hinblick auf die Cs (Tabelle 15), liegt der Wert nach Zugabe einer Mischung von IPA und IPM bei $5,0 \times 10^{-2}$ % (m/m). Das bedeutet, dass die Cs von BM-17-V in Basiscreme mit einer IPA/IPM-Kombination um das 3-fache höher ist als in der Basiscreme. Die höhere

Permeabilität der Rezeptur mit 5% IPA und 5% IPM-Zusatz kann durch die Verbesserung der Wirkstofflöslichkeit in der Grundlage erklärt werden.

Tabelle 15: Sättigungskonzentration von BM-17-V in verschiedenen Formulierungen bei 20°C, n=1

Grundlage	Cs von Betamethason-17-valerat (% m/m)	Quotient $\frac{C_{s\text{Basiscreme+Enhancer}}}{C_{s\text{Basiscreme}}}$
Basiscreme DAC*	$16,0 \times 10^{-3}$	1
Basiscreme DAC + 5% IPA + 5% IPM*	$5,0 \times 10^{-2}$	3,1

4.4.3. DSC Untersuchung des exzidierten humanen Stratum corneum

Entsprechend thermoanalytischer Untersuchungen von humanem Stratum corneum [Van Duzee, 1975; Golden et al., 1987] sind in DSC-Thermogrammen vier endotherme Phasenübergänge im Bereich (30-105 °C) zu registrieren. T1 (40 °C) und T2 (65 °C) entsprechen reinen interzellularen Lipiden, T3 (80 °C) entspricht einem Komplex interzellulärer Proteine mit Lipiden in der Membran von Korneozyten, T4 (105 °C) entspricht der Denaturierung von intrazellulärem Keratin. Anhand von Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen von T2 und T3, die unabhängig vom Spender im DSC-Thermogramm von SC immer vorhanden sind, während T1 und T4 häufig fehlen, können Veränderungen der Lipidstruktur erkannt werden.

Abbildung 32 zeigt DSC-Thermogramme von unbehandeltem und behandeltem SC. IPM und IPA wurden in einer Konzentration von 5 % (m/m) in WS sowohl getrennt als auch in Kombination eingearbeitet. Außerdem wird der Einfluss von IPM bzw. IPA als einzelne Substanzen dargestellt. Der Einfluss der eingesetzten Vehikel auf die SC-Mikrostruktur wird außerdem in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Behandlung des SC mit WS führte zur Verschiebung der beiden Peaks zu tieferen Temperaturen und zwar um 6,35 °C auf eine Phasenübergangstemperatur von 62,26 °C (T2) und um 4,26 °C auf 76,02 °C (T3). Eine Behandlung von SC bedeutet, dass dieses gemäß Kapitel 3.2.17. mit den unterschiedlichen Substanzen bzw. Formulierungen inkubiert wurde. Laut (Leopold und Lippold, 1995a) ist eine Verschiebung der Peaks um mehr als 3 °C als statistisch signifikant zu beurteilen. Die Verschiebung der beiden Phasenumwandlungen lag zwar oberhalb des in der Literatur als signifikant angegebenen Wertes, aber unter Berücksichtigung der später erhaltenen Werte an einem anderen Spender (Abbildung 33), kann dennoch nicht von einer eindeutigen Veränderung der Mikrostruktur des SC gesprochen werden. Die o.a. Ergebnisse weichen trotzdem von früher beschriebenen Literaturdaten ab [Refai und Müller-Goymann, 2002],

welche über einen vernachlässigbaren Effekt von WS und anderen DAB Grundlagen aufgrund der geringen Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur um ca. 1 °C berichteten. Nach Behandlung des SC mit WS und einem 5 %-igen IPA-Zusatz sind Phasenübergänge bei deutlich niedrigeren Temperaturen zu finden, und zwar bei 56,4 °C, 64,14 °C und 74,18 °C. Diese starken Verschiebungen weisen eine deutliche Veränderung der SC- Mikrostruktur nach und korrelieren mit einer erhöhten Permeabilität der epidermalen Schicht im Permeationsexperiment. Die Phasenumwandlungstemperatur bei 64,14 °C tritt auch nach der Behandlung des SC mit reinem IPA auf, wobei reines IPA einen stärkeren Effekt als WS + 5% IPA zeigt. IPA, ein gutes Lösungsmittel, könnte das Auflösen einiger Lipide der SC-Lipidschichten ermöglichen, was zu einer Erhöhung der Penetration für BM-17-V führen könnte. Wie aus Abbildung 32 ersichtlich ist, führt die Behandlung des SC mit reinem IPA zum Verschwinden des T2 Peaks und zu einer starken Verschiebung von T3 um 16,14°C; was entsprechend auf ein Herauslösen der interzellularen Lipide sowie auf eine Veränderung des Komplexes der interzellularen Proteine und Lipide in der Membran der Korneozyten hindeutet.

Der flüssige Ester IPM zeigt ebenfalls einen Effekt auf die Struktur des SC. Die Verschiebung der beiden Phasenumwandlungen zu tieferen Temperaturen beträgt 8,41 °C (T2) und 7,56 °C (T3), was auf eine deutliche Veränderung der SC Mikrostruktur hinweist. Diese Verschiebung darf jedoch nicht als Verflüssigung der Lipide interpretiert werden, wie in früher publizierten Arbeiten postuliert wurde [Barry, 1987a; Leopold und Lippold, 1995a,b], da die durchgeführten Permeationsuntersuchungen eher auf eine Verdichtung und damit auf eine Erhöhung der Barriereigenschaften des SC hinweisen. IPM kann dank seiner ähnlichen Lipophilie im Vergleich zur Ölsäure in die Lipiddoppelschicht des SC eindringen und lateral über seine polaren Molekülteile mit der polaren Lipidkopfgruppen in Wechselwirkungen treten [Smith und Maibach, 1995] und damit zur Verdichtung oder Verfestigung des SC führen. Wie in der Arbeit von Brinkmann und Müller-Goymann (2005) publiziert wurde, reduzierte IPM den Netzebenenabstand hexagonal gepackter Lipide und erhöhte denjenigen orthorhombisch gepackter Lipide. Das würde eine Veränderung der Struktur der Lipide bedeuten und damit im Einklang mit den vorliegenden Permeationsergebnissen sein.

Die beste Permeabilität im Hinblick auf BM-17-V zeigte die Zubereitung WS mit 5%-igem IPA und 5%-igem IPM Zusatz. Aus Abbildung 32 ist zu entnehmen, dass SC vor und nach der Behandlung signifikante Unterschiede in der Position der Phasenübergangstemperaturen aufweist. Nach der Behandlung des SC mit der Formulierung werden Peak (T2) und Peak (T3) zu niedrigeren Temperaturen von 61,3 °C und 70,6 °C verschoben. Das weist auf eine Veränderung der Barriereigenschaften des SC hin, im Sinne einer Deorganisation der

Lipidstruktur oder eines Neuaufbaus einer andersartigen Lipidstruktur. Andererseits könnte auch eine Denaturierung von Proteinen stattgefunden haben.

Die zusätzlichen Peaks bei 30 °C und 45 °C sind allein auf nicht entfernte Formulierungsreste im SC nach der Behandlung zurückführen.

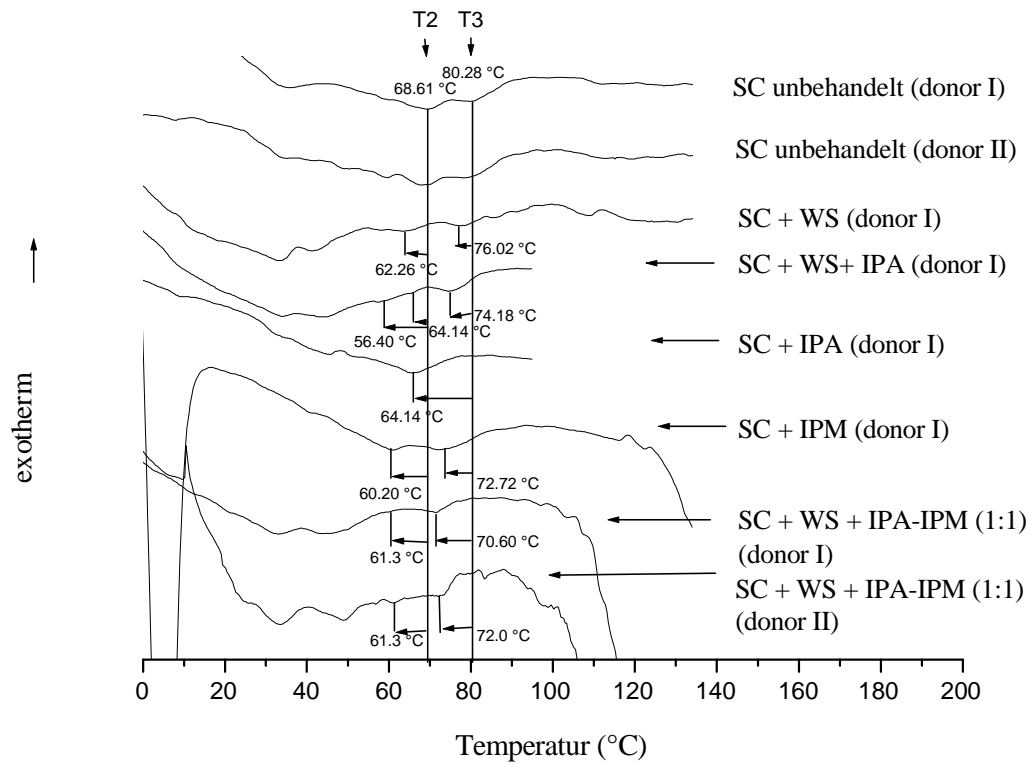


Abbildung 32: DSC Thermogramme von Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre)

Tabelle 16: Phasenübergangstemperaturen von humanem Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre

Stratum corneum behandelt mit	T2 (°C)	T3 (°C)
Ø	68,61	80,28
WS	62,26	76,02
Isopropylalkohol	-	64,14
Isopropylmyristat	60,20	72,72
WS + 5%IPA	56,40 und 64,14	74,18
WS + 5%IPA + 5%IPM (Spender I)	61,3	70,60
WS + 5%IPA + 5%IPM (Spender II)	61,3	72,0

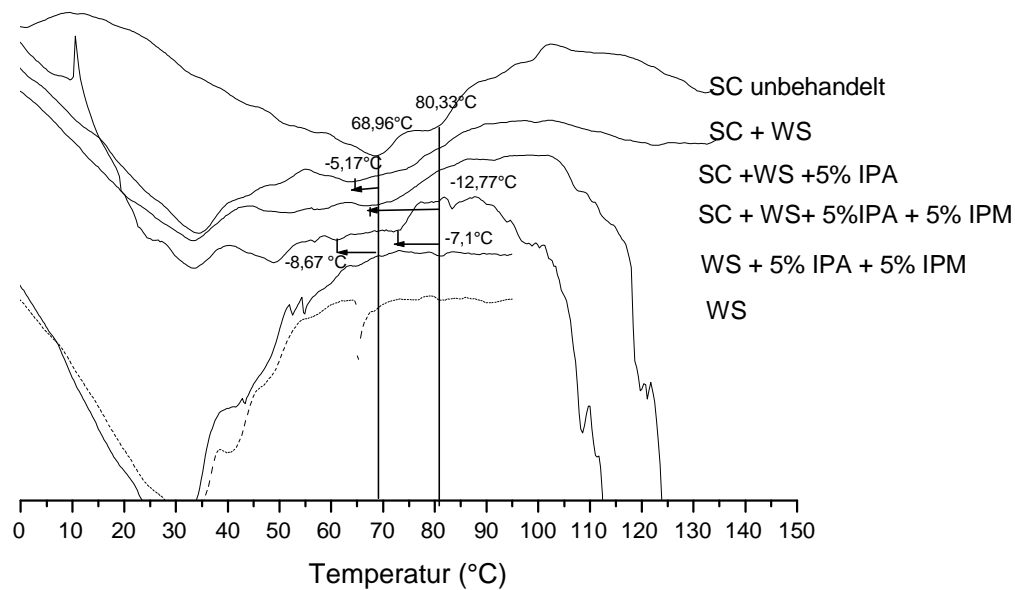


Abbildung 33: DSC Thermogramme von Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 63 Jahre

Tabelle 17: Phasenübergangstemperaturen von humanem Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 63 Jahre

Stratum corneum behandelt mit	T2 (C°)	T3(C°)
Ø	68,96	80,33
WS	63,79	80,33
WS + 5%IPA	-	67,56
WS + 5%IPA + 5%IPM	60,3	73,23

Der kombinierte IPA/IPM-Effekt ist ebenfalls an SC eines anderen Spenders untersucht worden, um die vorher durchgeführten Ergebnisse zu bestätigen.

Abbildung 33 zeigt DSC-Thermogramme des unbehandelten (Spender weiblich, Abdomen 63 Jahre) und behandelten SC. Die Behandlung des SC (anderer Spender) mit WS führt zu einer Verschiebung des Peaks (T2) um 5,17°C, die Position des Peaks (T3) bleibt unverändert. Die Verschiebung des Peaks (T2) liegt oberhalb des in der Literatur als signifikant angegebenen Wertes [Leopold und Lippold, 1995a], darüber hinaus wird diese Verschiebung als eine

Veränderung der SC Mikrostruktur beurteilt. Bei Behandlung des SC mit der Grundlage WS und einem 5 %-igen IPA-Zusatz kam es zu einem Verschwinden des Peaks (T2) und zu einer starken Verschiebung des Peaks (T3) um 12,77 °C. Dieser Effekt wird allein durch das reine IPA verursacht (siehe Abbildung 32). Die Behandlung des SC mit der WS und einer Kombination von IPA/IPM führt zur Verschiebung des Peaks (T2) um 8,7 °C und des Peaks (T3) um 7,1 °C zu niedrigeren Temperaturen. Daraus kann man schließen, dass die Kombination von IPA und IPM in einer Konzentration von jeweils 5% in der wasserfreien Zubereitung WS einen deutlichen Effekt auf die strukturelle Veränderung der SC-Hautlipide ausübt.

Abbildung 34 zeigt DSC-Thermogramme des hydratisierten SC (100 % Wasseranteil) und mit Basiscreme DAC behandelten SC (40 % Wasseranteil). Außerdem wurde Basiscreme mit IPA/IPM kombiniert, die in einer Konzentration von jeweils 5 % (m/m) in die Formulierung eingearbeitet wurden. Wenn man unbehandeltes und hydratisiertes SC eines Spenders miteinander vergleicht, sieht man gewisse Unterschiede in der Position der beiden Phasenübergangstemperaturen. Wie Abbildung 34 darstellt, zeigt hydratisiertes SC etwas niedrigere Phasenübergangstemperaturen bei 65,23 °C (T2) und bei 75,59 °C (T3) im Vergleich zu nicht hydratisiertem SC (Abbildung 32). Die vollständige Hydratation des SC führt zur Verschiebung der beiden Phasenübergänge T2 und T3 um 3,4 und 4,7 °C. Diese Verschiebung ist laut [Leopold und Lippold, 1995a] eine statistisch signifikante Verschiebung und deutet auf einen strukturändernden Effekt des Wassers. Das Wasser allein hat einen keratin-denaturierenden Effekt auf das Stratum corneum, indem es sich an Keratin bindet, die Lipidketten mittels Hydratation der polaren Kopfgruppen weitet [Potts und Francoer, 1991; Kurihara-Bergstrom et al., 1990] und damit eine Zunahme der Porosität der Lipidschicht fördert.

Die Behandlung des SC mit Basiscreme DAC führt zu einer leichten Verschiebung des Peaks (T3) um 4,28°C, die Lage des Peaks (T2) bleibt unverändert. Berücksichtigt man den weiteren fluidisierenden Effekt der Basiscreme (40 % Wassergehalt) auf die Lipide über den der Vollhydratisierung hinaus (100 % Wassergehalt), könnte man schlussfolgen, dass nicht nur Wasser sondern die Hilfsstoffe der Zubereitung z.B. Propylenglykol eine Veränderung der SC Mikrostruktur bewirken. Gemäß Literatur [Bouwstra et al., 1992b] wurde mit Hilfe von Röntgenuntersuchungen eine durch die Vorbehandlung mit Propylenglykol unveränderte Interferenz nachgewiesen und damit eine laterale Insertion zwischen den Lipidkopfgruppen angenommen. Brinkmann (2005) postulierte, dass die Propylenglykole zwischen den hydrophilen Kopfgruppen der Doppelschicht sowohl senkrecht als auch waagrecht zu den Längsachsen der Lipidmoleküle orientiert sein müssten. Aufgrund der Verschiebung der T3 - Phasenumwandlung nach der Applikation von Basiscreme ist von einer Änderung der SC-

Lipidstruktur auszugehen. Diese Befunde weichen von bereits publizierten Ergebnissen ab [Winkler und Müller-Goymann, 2005]. Bei Winkler und Müller-Goymann (2005) war ein Effekt von Basiscreme auf das SC aufgrund der geringen Verschiebungen von T2 und T3 um 1,5 °C als vernachlässigbar interpretiert worden.

Die Behandlung von SC mit Basiscreme, die IPM- und IPA-Zusätze enthält, führt zu weiteren Verschiebungen der beiden Peaks. Es kommt zur Verschiebung des Peaks (T2) um 5,73 °C und des Peaks (T3) um 5,37 °C. Diese Verschiebungen liegen oberhalb des von Leopold und Lippold (1995) als signifikant angegebenen Wertes und werden als Hinweis auf strukturelle Veränderungen der Hautlipide gewertet. Die Verschiebungen sind gegenüber vollhydratisiertem SC kleiner als bei Behandlung von teilhydratisiertem SC mit der IPA-IPM-haltigen Formulierung, weil die Hydratation von SC bereits eine deutliche Verschiebung der Phasenumwandlungen zu niedrigeren Temperaturen verursacht. So resultieren unabhängig vom ursprünglichen Hydratationsgrad die gleichen T2 und T3 Umwandlungstemperaturen nach der SC-Behandlung, weil der Wassergehalt der Formulierung seinen entsprechenden Beitrag leistet.

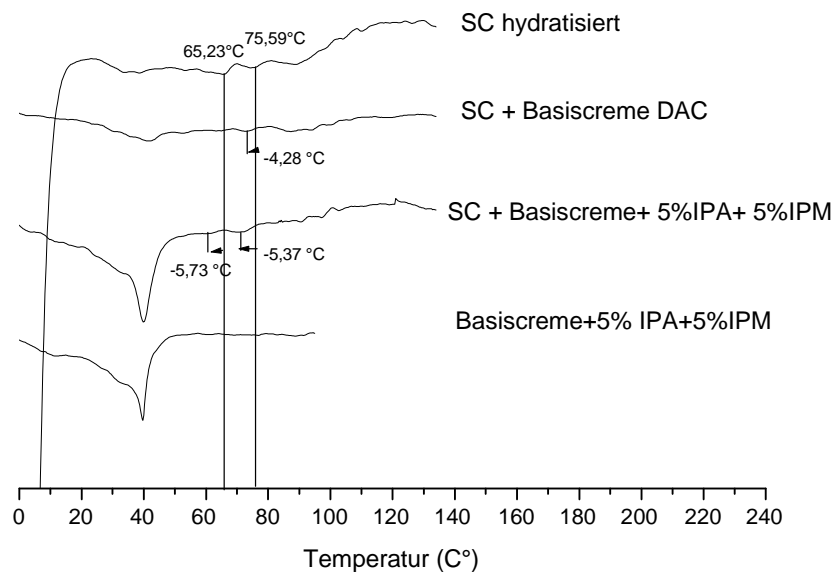


Abbildung 34: DSC-Thermogramme von hydratisiertem Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre

Tabelle 18: Phasenübergangstemperaturen von hydratisiertem humanen Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre

Stratum corneum behandelt mit	T2 (°C)	T3 (°C)
Ø	65,23	75,59
Basiscreme DAC	65,23	71,31
Basiscreme DAC +5%IPA+5%IPM	59,50	70,22

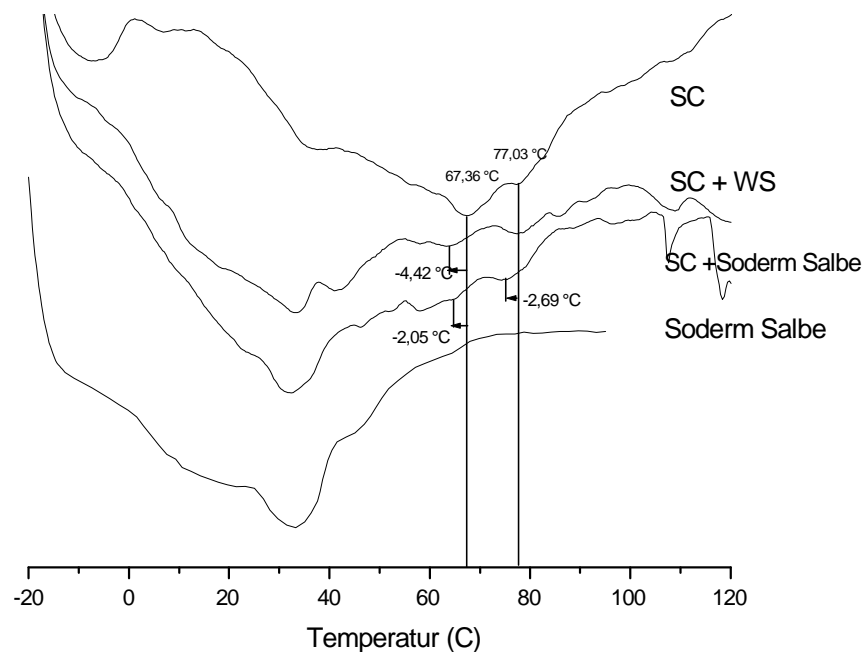


Abbildung 35: DSC Thermogramme von Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre

Tabelle 19: Phasenübergangstemperaturen von humanem Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 69 Jahre

Stratum corneum behandelt mit	T2 (°C)	T3 (°C)
Ø	67,36	77,03
WS	62,94	77,03
Soderm® Salbe	65,31	74,34

Um einen Effekt des Wirkstoffes auf das SC auszuschließen, wurde eine Untersuchung mit dem Fertigarzneimittelprodukt Soderm® Salbe durchgeführt. Die Abbildung 35 zeigt DSC-Thermogramme von unbehandeltem und mit Soderm® Salbe behandeltem sowie mit WS behandeltem SC. Der Einfluss der eingesetzten Vehikel auf die Mikrostruktur des Stratum corneum ist in der Tabelle 19 zusammengefasst. Die Phasenübergänge des unbehandelten und mit Soderm® Salbe behandelten SC unterscheiden sich um 2 °C (T2) und 2,69 °C (T3). Dieser Unterschied kann als nicht signifikant betrachtet und damit eine Veränderung der SC-Struktur als wenig wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Es ist daraus zu schließen, dass der Wirkstoff BM-17-V keine Wechselwirkungen mit den Hautlipiden eingeht.

4.4.4. Röntgenuntersuchungen (WAXD) von humanem Stratum corneum

Röntgenweitwinkeluntersuchungen geben Aufschluss über die molekulare Ordnung der SC-Komponenten. Aus (WAXD) Untersuchungen können Informationen über die Packung der Lipide sowie die Struktur der Proteine im interzellularen Bereich gewonnen werden. Es kann differenziert werden, ob SC Lipide als Flüssigkeit, Gel (hexagonal) oder in kristalliner (orthorhombische) Packung angeordnet sind. Zwei Reflektionen bei 0,41 nm und 0,37 nm [Bouwstra et al., 2001a,b] können detektiert werden, die als orthorhombisch laterale Packung der Lipide interpretiert werden. Die Reflektion bei 0,41 nm wird außerdem als hexagonale Packung der Alkylketten interpretiert. Um die Nahordnung der SC-Lipide und einen eventuellen Einfluss der Hilfsstoffe auf die Nahordnung der Lipide festzustellen, wurde exzidiertes humanes Stratum corneum mit Hilfe der Röntgenweitwinkelbeugung untersucht.

4.4.4.1. Röntgenuntersuchungen (WAXD) von humanem Stratum corneum, behandelt mit IPA/IPM

Tabelle 20 zeigt die Gitternahordnungsabstände der Lipidpackung des unbehandelten und mit unterschiedlichen Grundlagen behandelten SC. Die WAXD-Daten, die in der Tabelle präsentiert werden, zeigen, dass sogar beim gleichen Spender Messschwankungen möglich sind. Bei der statistischen Berechnung nach der t-Studentverteilung mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ergab sich, dass alle berücksichtigten Interferenzen im Diffraktogramm des SC mit den Interferenzen nach Behandlung mit den Grundlagen innerhalb der Regelgrenzen übereinstimmen. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Effekt der untersuchten Zubereitungen auf die Lipidpackung nicht nachweisbar ist. Darüber hinaus lassen sich mit Hilfe der Röntgenmethode eventuelle Veränderungen in der Lipidpackung nicht differenzieren. Die zusätzlichen Interferenzen im SC-Diffraktogramm bei niedrigeren

Netzebenenabständen nach der Behandlung mit WS + 5% IPA+5% IPM sowie nach der Behandlung mit Soderm® Salbe werden allein auf vorhandene Reste der Zubereitungen zurückgeführt (Tabelle 21). Interessanterweise hat sich ergeben, dass Vaseline die gleichen Interferenzen im Diffraktogramm wie das unbehandelte SC zeigt (bei 0,3708 und 0,41nm). Als mögliche Erklärung dafür gilt die Strukturvorstellung der Vaseline von Häusler (1989), dass sich mehr als 25 % der Gesamtmasse der Vaseline innerhalb von Lamellenstapeln befinden. Der Rest liegt frei in flüssiger Form vor und wird durch das Kristallisat immobilisiert. Diese Strukturvorstellung hebt sich von der früheren Vorstellung ab, gemäß der Vaseline bestehend aus Fransenmizellen mit kristallinen und amorphen Bereichen dargestellt wurde.

Tabelle 20: Röntgenweitwinkelinterferenzen von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich mit vorbehandeltem SC [nm] (Spender: weibl., 63 Jahre, Abd.)

Stratum corneum					
behandelt mit	nm	nm	nm	Nm	nm
Ø				0,3727	0,4065
Ø				0,3707	0,4111
Ø				0,3688	0,416
WS + 5% IPA + 5% IPM	0,219	0,246	0,289	0,3688	0,4111
WS + 5% IPA + 5% IPM	0,2216	0,248	0,289	0,3707	0,4111
WS + 5% IPA + 5% IPM				0,3727	0,4159
WS + 5% IPM				0,3688	0,41
WS + 5% IPA				0,3727	0,41
Celestan-V® Creme				0,3708	0,41
Soderm® Salbe			0,3012	0,3707	0,4111
Soderm® Salbe				0,3707	0,4065
Soderm® Salbe				0,3689	0,41

Mit n = 12, FG = 11, UG (0,05) = 0,3690; OG (0,05) = 0,3722

UG (0,05) = 0,4077; OG (0,05) = 0,4138

Tabelle 21: Röntgenweitwinkelinterferenzen von Grundlagen [nm]

Halbfeste Formulierung	nm	nm	Nm	nm	nm
WS+5%IPA+5%IPM	0,2203	0,24789	0,2965	0,3689	0,41
WS (Unguator)	0,2203	0,248	0,2965	0,3708	0,41
WS (per Hand)				0,373	0,4126
Basiscreme DAC				0,3708	0,41
Vaseline				0,3708	0,41

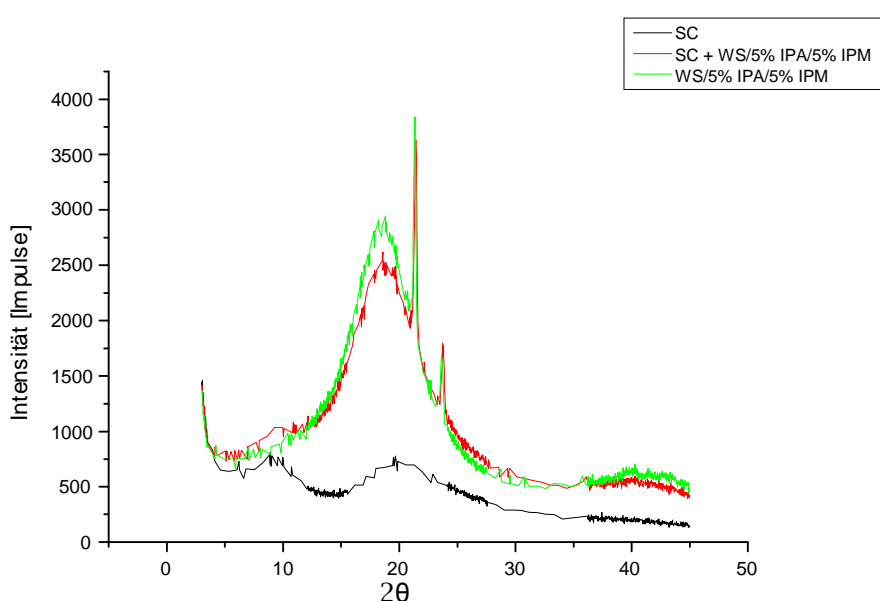


Abbildung 36: Röntgenweitwinkeldiffraktogramme von Wollwachsalkoholsalbe mit jeweils 5% IPA und IPM, von Stratum corneum, unbehandelt bzw. mit der Formulierung behandelt

Abbildung 36 zeigt die Röntgendiffraktogramme von unbehandeltem und mit der Formulierung WS + IPA/IPM behandeltem SC. Die Analyse erfolgte mit einer anderen Röntgenmethode (WAXD Goniometer PW3050/60).

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ergibt das unbehandelte SC drei Röntgeninterferenzen bei $2\theta = 6,07^\circ$, $2\theta = 9,23^\circ$, $2\theta = 20,38^\circ$, entsprechend den Gitterabständen von 0,435nm, 0,9581nm und 1,456nm. Die Grundlage WS + IPA/IPM zeigte drei Interferenzen bei $2\theta = 18,5^\circ$, $2\theta = 21,37^\circ$ und $2\theta = 23,74^\circ$, welche sich mit der SC- Interferenz bei $2\theta = 20,38^\circ$ überschneiden. Nach der Behandlung des SC mit der Formulierung WS/IPA/IPM kam es zu einer leichten Verschiebung des Signals $2\theta = 9,23^\circ$. Wegen der Überschneidung der Diffraktogramme im Bereich von $2\theta = 20,38^\circ$ wurde diese Methode für die vaselinhaltigen Formulierungen als ungeeignet erachtet.

4.4.5. Zusammenfassende Diskussion über die Wirkung von Isopropylmyristat und Isopropylalkohol sowie ihrer Kombination auf das Permeationsverhalten von BM-17-V

In diesem Kapitel wurde der Effekt von IPM und IPA auf das Permeationsverhalten von BM-17-V aus unterschiedlichen Formulierungen und der Effekt, den beide Hilfsstoffe auf die SC-Mikrostruktur ausüben, untersucht.

Die Zugabe von IPM zur Wollwachsalkoholsalbe (WS) führte zur Reduzierung der BM-Permeation. Dieses Phänomen der verschlechterten Permeabilität bei der Zugabe von IPM wurde in der Literatur für das Kortikosteroid Hydrokortison bereits beschrieben [Brinkmann und Müller-Goymann, 2003]. Als mögliche Erklärung dafür gilt eine abnehmende Löslichkeit des Wirkstoffes im Vehikel nach der Zugabe von IPM, was als Ursache für die Abnahme des Diffusionskoeffizienten dienen könnte. Ein Einfluss von IPM auf die SC-Mikrostruktur wurde in kalorimetrischen Untersuchungen gezeigt. Die Behandlung des SC mit IPM hat eine Verlagerung der Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen zur Folge. Eine solche Verschiebung kann nicht generell als eine Verflüssigung der SC-Lipide erklärt werden, wie dies von einigen Autoren bereits postuliert wurde [Barry, 1987a; Golden et al., 1987]. Golden et al. (1987) postulierte, dass IPM, dank ähnlicher Lipophilie zur Ölsäure, in die Lipidlamellen eingebaut wird und damit eine dichte Packung der Lipidlamellen stören könnte. Andere Autoren haben vermutet, dass IPM im SC als separate Phase vorliegen kann [Francouer et al., 1990; Walker und Hadgraft, 1991]. Rowat et al. (2006) berichteten, dass Ölsäure eine Fraktion der endogenen Komponenten aus dem SC extrahieren kann. Als getrennte Phase soll Ölsäure die Reduzierung der kristallinen Fraktion der Lipide bewirken und so mehr permeable Wege innerhalb der Lipiddomänen schaffen. Leopold und Lippold (1995a) sowie Smith und Maibach (1995) berichteten über die Verfestigung des SC durch die Penetration von IPM-Molekülen in die SC-Lipiddoppelschichten und ihren Einbau zwischen den Kohlenwasserstoffresten der SC-Lipide. Nach der Behandlung des SC mit IPM soll eine Zunahme der orthorhombisch geordneten Lipide auf Kosten einer Abnahme der hexagonalen Lipidpackung erfolgen. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde weiterhin eine Integrierung der IPM-Moleküle in die Lipidkette abgeleitet [Brinkmann und Müller-Goymann, 2005], was einer gleichzeitigen Verfestigung der Lipide entspricht. Mit diesen in der Literatur beschriebenen Interpretationen stimmen die Ergebnisse der durchgeführten Studie über die dichtgepackte Lipidorganisationstruktur verbunden mit verstärkten Barriereigenschaften des SC überein. Bei der Zugabe von Isopropylalkohol (IPA) zur Wollwachsalkoholsalbe wurde die Sättigungskonzentration von BM-17-V im Vehikel wesentlich erhöht. Bei hoher Sättigungskonzentration des Wirkstoffs werden Penetration in die Haut sowie Permeation durch die SC-Barriere schneller sein. Kalorimetrische Untersuchungen haben gezeigt, dass

die Applikation von reinem IPA sowie in einer Kombination mit WS zu einer Interaktion mit den Hautlipiden führte. Diese neuen Ergebnisse weichen von den früher beschriebenen DSC-Daten ab [Brinkmann und Müller-Goymann, 2003; Refai, 2001], die einen vernachlässigbaren Effekt von IPA auf die SC-Mikrostruktur feststellten. Das Ergebnis der vorliegenden DSC-Untersuchungen stimmt jedoch mit einer kürzlich publizierten Hypothese einer Studie zu Alkoholeinfluss überein [Williams und Barry, 2004]. Hier wurde postuliert, dass Alkohole, wie z.B. IPA, einige Lipide und Proteine aus dem SC extrahieren und damit die Porosität des SC erhöhen könnten.

Der Zusatz einer IPA- und IPM-Kombination zu den halbfesten Zubereitungen, wie Wollwachsalkoholsalbe und Basiscreme DAC verursachte die höchste BM-Permeationsrate. Der synergistische Effekt, den beide Enhancer in Kombination zeigten, lässt sich einerseits durch die verbesserte Wirkstofflöslichkeit und andererseits durch eine Veränderung der Stratum corneum Mikrostruktur erklären. Wie kalorimetrischen Untersuchungen zu entnehmen war, hat die Zubereitung WS + IPA + IPM nach Vorbehandlung des SC dessen Mikrostruktur verändert. Die kalorimetrischen Daten weisen auf eine Erhöhung der Fluidität des SC nach einer Vorbehandlung mit der Formulierung, die mit IPA und IPM angereichert worden war, hin. Die Röntgenweitwinkelergebnisse haben zwar messtechnisch bedingt keinen Effekt dieser Hilfsstoffe auf die Lipidpackung des SC nachweisen können, doch kann aus den DSC -Daten vermutet werden, dass die Kombination IPA/IPM (1:1) zur Veränderung der Barrierestruktur geführt hat. Isopropylalkohol, ein gutes Lösungsmittel, könnte einige Lipide und Proteine aus dem Stratum corneum extrahieren und damit die Porosität des SC erhöhen. Oder IPA könnte die Lipidketten aufweiten und damit die Ordnung der Lipidlamellen stören. Isopropylmyristat, dank seiner ähnlichen Lipophilie zur Ölsäure, könnte ebenfalls auf spezielle Weise ins SC eingebaut werden, so dass die beste Permeabilität für die Kortikosteroide durch das SC resultiert.

Die Kombination von IPM und IPA im gleichen Verhältnis und Anteil in der wasserhaltigen Grundlage Basiscreme DAC führte auch zur Verschiebung der beiden SC-Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen. Diese Verschiebung war hauptsächlich auf den Wassereinfluss auf das SC zurückzuführen, denn die wasserhaltige Grundlage Basiscreme DAC hatte bereits einen hydratisierenden Effekt auf das SC gezeigt. Die zusätzliche Zugabe von beiden Enhancern erhöhte einerseits die Wirkstofflöslichkeit im Vehikel wesentlich, was eine Erhöhung des Diffusionskoeffizientes hervorrief. Andererseits veränderten beide Hilfsstoffe die SC-Struktur. Die Verschiebungen der beiden Phasenübergangstemperaturen nach der Behandlung des SC mit Basiscreme + IPA/IPM waren stärker ausgeprägt als die in der Literatur [Leopold und Lippold, 1995a] als statistisch

signifikant angegebenen 3 °C und konnten deswegen als Veränderung der SC-Mikrostruktur interpretiert werden.

Im Laufe der durchgeführten DSC Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass der Wirkstoff BM-17-V nicht in Wechselwirkung mit den Lipiden und Proteinen des SC tritt.

4.5. Untersuchung der BM-17-V-Permeation und der Permeation anderer Kortikosteroide aus Emulsionen.

Nachdem festgestellt wurde, dass Vaseline die Auswertung der Röntgenuntersuchungen stört und damit eine eventuelle Beeinflussung der SC-Mikrostruktur nicht nachweisbar ist, wurden für weitere Untersuchungen des Enhancereffekts drei unterschiedliche vaselfreie Formulierungen ausgewählt: Soventol® Creme (bereits beschriebene Grundlage mit den besten Permeationseigenschaften im Hinblick auf HC und HC-acetat [Refai, 2001; Alberg, 1998], Thermogel [Grüning und Müller-Goymann, 2006, bereits publiziert als beste Grundlage für 5-Aminolävulinsäure (ALA)] und Müstella Creme (Nerzölemulsion, Kosmetikum). In diesem Kapitel werden die Permeationsdaten, kalorimetrischen und röntgenografischen Daten präsentiert.

4.5.1. Permeationsuntersuchungen

Alle untersuchten Systeme enthalten unterschiedliche Enhancer. Soventol® Creme enthält Isopropylalkohol und Isopropylmyristat. Der Wassergehalt beträgt 64 % (m/m) gemäß einer Karl-Fischer Titration, der Gehalt an Isopropylalkohol beträgt 18 % (m/m) [Alberg, 1998], die gesamte wässrige Phase entspricht 85,1 % (m/m). Thermogel enthält 12,5 % Isopropylalkohol [Grüning und Müller-Goymann, 2006]. Müstella Creme enthält weniger als 5 % Ethanol, die gesamte wässrige Phase entspricht 85,6 % (Thermogravimetrie).

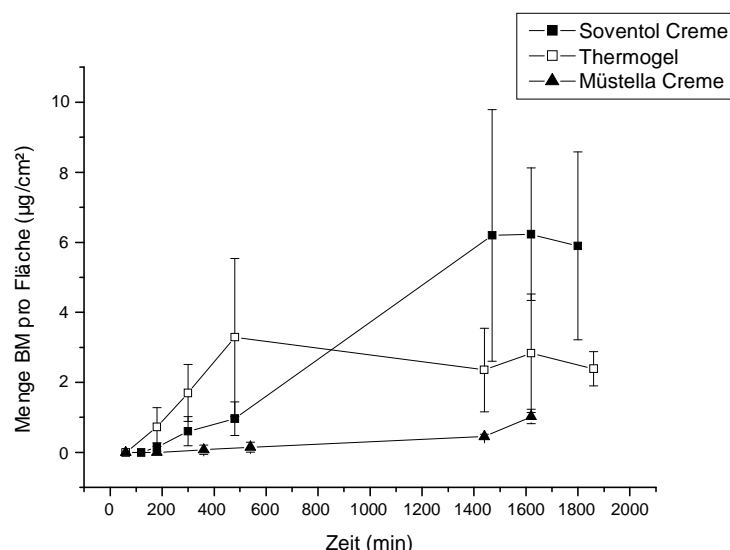


Abbildung 37: Permeation von BM aus verschiedenen Zubereitungen mit 0,1% BM-17-V, Spender (weiblich, Abdomen, 71 Jahre), n=6

Die Ergebnisse der Permeationsstudie sind in der Abbildung 37 zusammengefasst. Die Abbildung 37 zeigt, dass Soventol® Creme nicht nur für HC [Refai und Müller-Goymann., 2002] und HC-acetat [Alberg, 1998] sondern auch für BM-17-V die bestpermeable Grundlage ist. Die Soventol® Creme ist eine Suspensionscreme, was eine lineare Zunahme der permeierten BM-Konzentration über 23 Stunden erlaubt. Die permeierte BM-Menge erreicht nach 30 Stunden 6 µg/cm². Im Vergleich zum Fertigarzneimittel Celestan-V® Creme zeigt die Zubereitung eine 10-fach bessere Permeation.

Die Permeationskurve aus dem Thermogel verläuft wesentlich flacher, obwohl in der ersten Phase der Untersuchung eine steile Steigung der permeierten BM-Menge bemerkbar ist. Die Konzentration an Isopropylalkohol ist in der Grundlage relativ hoch, dadurch erhöht sich aufgrund der strukturellen Veränderungen der SC-Mikrostruktur die SC-Porosität. Dieser Permeationskurvenverlauf, entspricht dem einer Lösungsalbe und stimmt mit der guten Löslichkeit des BM-17-V in der Zubereitung überein. Der Flux-Quotient, der Tabelle 22 zu entnehmen ist, zeigt, dass die Permeationsgeschwindigkeit aus der Soventol® Creme 4,5-fach höher als aus dem Thermogel und um den Faktor 10,4 höher als aus Müstella Creme ist. Solche Permeabilitätsunterschiede sind durch einen synergistischen Effekt der kombinierten IPA und IPM gegenüber dem reinen IPA-Effekt des Thermogels zu erklären. Müstella Creme zeigt die schlechteste Permeabilität der genannten Zubereitungen (0,9 µg/cm² nach 27 Stunden). Die Formulierung enthält neben Ethanol keine weiteren Enhancer und zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Basiscreme DAC (Abbildung 41).

Im Laufe der Permeationsuntersuchung waren im Akzeptormedium unterschiedliche Abbauprodukte von BM-17-V nachzuweisen. Deshalb wurde in der grafischen Darstellung die Summe aller permeierten Metabolite aufgetragen. Im Laufe der Permeationsuntersuchung war aus Soventol® Creme nicht vollständig abgebauter Wirkstoff BM-17-V neben seinem Hydrolyseprodukt nachzuweisen. Diese Grundlage scheint eine Stabilisierung für BM-17-V zu bieten. Aus dem Thermogel wurde bei der Permeation das Hydrolyseprodukt BM und ein weiteres BM-Abbauprodukt 9 α -Prednisolon nachgewiesen. Dieses Phänomen des weiteren Abbaus von BM in 9 α -Prednisolon wurde bereits im Kapitel 4.4.2. gezeigt. Hier ist zu vermuten, dass die hohe IPA-Konzentration in O/W Systemen die weitere chemische Reaktion fördert. Bei dem Permeationsexperiment aus der Müstella Creme permeierte nur der Wirkstoff BM-17-V.

Im Vergleich zu den vorher beschriebenen Ergebnissen über das Permeationsverhalten der Fertigarzneimittel und DAB Grundlagen hinsichtlich BM-17-V, sieht man einen deutlichen Vehikeleffekt auf die Permeabilitätsverbesserung, was auf strukturelle Veränderungen der Hornhaut hindeutet.

Tabelle 22: Arzneistoffflux, Flux-Quotient und Permeationskoeffizienten für die Permeation von BM aus 0,1% BM-17-V enthaltenden Zubereitungen Soventol® Creme und Thermogel durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre (n=6-9)

Grundlage	Betamethason Flux J [g · cm ² · s ⁻¹]	Flux- Quotient $\frac{J_{\text{Zubereitung}}}{J_{\text{Müstella}}}$	Permeationskoeffizient [cm/s]
Soventol® Creme	$6,84 \times 10^{-11} \pm 4,2 \times 10^{-13}$	10,4	-
Thermogel	$1,52 \times 10^{-11} \pm 6,6 \times 10^{-13}$	2,3	$1,52 \times 10^{-10} \pm 1,3 \times 10^{-11}$
Müstella Creme	$0,66 \times 10^{-11} \pm 0,3 \times 10^{-13}$	1	

4.5.2. DSC Untersuchung

Abbildung 38 zeigt DSC-Thermogramme des hydratisierten und mit unterschiedlichen Grundlagen behandelten SC: Soventol® Creme, Thermogel, Müstella Creme. Das hydratisierte Stratum corneum (100 % Wassergehalt) zeigt zwei Phasenübergänge bei 68 °C (T2) und bei 81 °C (T3) (Tabelle 23). Die Behandlung des SC mit dem Thermogel führt zu einer Verschiebung des Peak (T2) um 7,01 °C, des Peak (T3) um 8,05 °C zu niedrigeren Temperaturen, was auf eine Verflüssigung der Lipide schließen lässt. Diese Ergebnisse

stimmen mit den bereits publizierten Ergebnissen [Grüning und Müller-Goymann, 2006] überein und werden durch die IPA-Wirkung auf die SC-Mikrostruktur erklärt. Daher ist nach der Applikation dieser Grundlage von einer Änderung der Lipidstruktur auszugehen. Die Behandlung des SC mit der Soventol® Creme führt auch zu einer deutlichen Verschiebung der beiden Phasenumwandlungen um 10,4 °C und um 9,8 °C zu niedrigeren Temperaturen. Der Effekt der Veränderung der SC-Mikrostruktur stimmt mit den früher publizierten Ergebnissen überein [Refai, 2001] und lässt sich durch den kombinierten Effekt von IPA und IPM erklären.

Die Vorbehandlung des SC mit Müstella Creme führt ebenfalls zur Verschiebung der Peaks zu niedrigeren Temperaturen, T₂ um 3,6 °C und T₃ um 6 °C. Die Verschiebung der beiden Phasenumwandlungen ist nur geringfügig größer als die in der Literatur [Leopold und Lippold, 1995a] als signifikant angegebene Verschiebung. Deshalb könnte man einen Effekt auf den Lipid-Protein Komplex und die Störung der Lipidpackung ausschließen.

Andererseits gehen die Verschiebungen von T₂ und T₃ über den Effekt der Vollhydratisierung von SC hinaus, so dass unter Berücksichtigung eines 85 % Wassergehalts in Müstella Creme davon auszugehen ist, dass die übrigen Bestandteile der Formulierung einen weitergehenden Einfluss auf die SC-Struktur ausüben und die beobachteten Verschiebungen nicht nur auf den Wassereinfluss zurückzuführen sind.

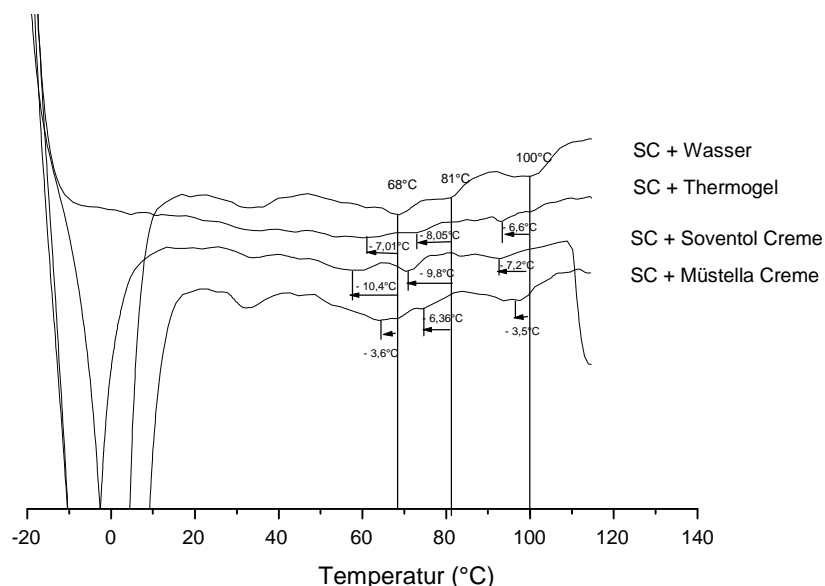


Abbildung 38: DSC-Thermogramme von Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre

Tabelle 23: Phasenübergangstemperaturen von humanem Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre

Stratum corneum behandelt mit	T2 (°C)	T3 (°C)
Wasser	68.00	81.00
Soventol® Creme	57,60	71,2
Thermogel	60,99	73,00
Müstella Creme	64,4	74,64

Soventol® Creme schafft eine Veränderung der Lipidpackung durch einen kombinierten Enhancer-Wirkung. Bei den anderen Zubereitungen könnten unterschiedliche Mechanismen der Strukturveränderung stattfinden, wie Herauslösen von Lipiden, Löslichkeitsverbesserung des Wirkstoffs im SC.

4.5.3. Röntgenmessungen des Stratum corneum, vorbehandelt mit unterschiedlichen Grundlagen

4.5.3.1. Röntgenweitwinkelmessung

Tabelle 24: Röntgenweitwinkelinterferenzen [nm] von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich mit vorbehandeltem Gewebe (Spender: weibl., 71 Jahre, Abdomen.)

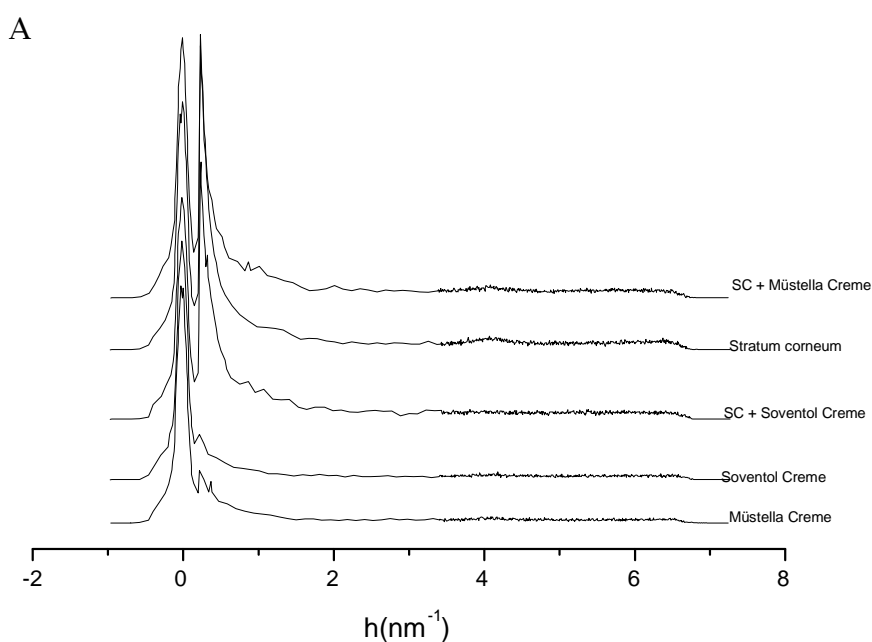
	nm	nm
SC	0,3727	0,4065
SC	0,3707	0,4111
SC	0,3688	0,416
SC + Soventol Creme	0,3727	0,413
SC + Müstella Creme	0,3727	0,413
Müstella Creme	-	0,4088
Soventol® Creme	-	-
SC + Thermogel	-	-

In Tabelle 24 werden die Ergebnisse der Röntgenweitwinkeluntersuchungen zusammengefasst. Auf Basis der Student-t-Verteilung wurden Konfidenzintervalle berechnet mit $n = 12$, $FG = 11$, $UG(0,05) = 0,3690$; $OG(0,05) = 0,3722$; $UG(0,05) = 0,4077$, $OG(0,05) = 0,4138$

Nach der Vorbehandlung mit Soventol® Creme und Müstella bleibt die Interferenz für die orthorhombisch geordneten Lipide unverändert, obwohl der Wert 0,3727 außerhalb der Grenzen liegt, tritt er aber bei einem Messwert für SC auf. Die hexagonale Lipidpackung bleibt ebenfalls unbeeinflusst. Die Ergebnisse dieser Studie deuten auf keine Veränderung der Netzebenenabstände.

4.5.3.2. Röntgenkleinwinkelmessung (SAXD)

Die SAXD Daten geben Informationen über die Auswirkung auf die Fernordnung der Lipide. Nach Behandlung des SC mit der Soventol® Creme kam es zu keiner Interferenz-Veränderung (Abbildung 39). Die Behandlung des SC mit der Müstella Creme führt zu einer Verstärkung der Interferenzen bei 6,4 nm. Die entstehende Interferenz lässt allein auf einen Glyceroleffekt schließen, welcher in der Literatur bereits beschrieben wurde [Brinkmann et al., 2005]. Sie erklärte das als eine Ausbildung der aufgeweiteten Lamellarschicht des SC durch Glycerol. Andere Mechanismen des Glyceroleinflusses auf die SC-Lipidmatrix sind jedoch vorstellbar.



B

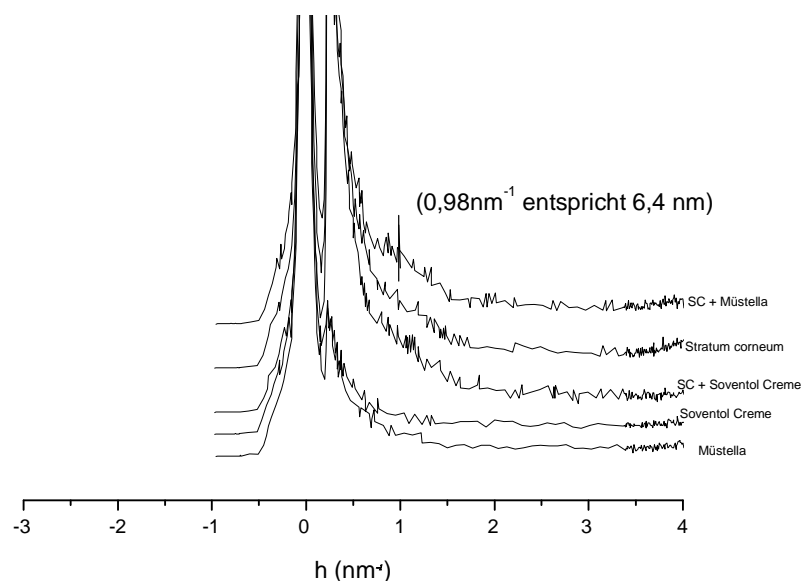


Abbildung 39: Röntgenkleinwinkelmessungen von Stratum corneum (Spender: weibl., 63 Jahre, Abd.) unbehandelt und vorbehandelt; A) Original-Daten, B) vergrößerter Ausschnitt nach mathematischer Glättung

4.6. Nerzöl in Dermatika

In Kapitel 4.5.1. wurde die nerzöhlhaltige Zubereitung Müstella Creme hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens für BM-17-V untersucht. Im Vergleich zur Soventol® Creme blieb jedoch diese Zubereitung in ihren Permeationseigenschaften etwas zurück. Aufgrund des breiten Eigenschaftsspektrums des Nerzöls war es interessant, die obige Zubereitung mit den in dieser Arbeit untersuchten Penetrationsförderern wie IPA und IPM weiter zu modifizieren. Nerzöl enthält >75 % an ungesättigten Fettsäureglyceriden. Es wird zur Zeit in kosmetischen Haarpflege- und Haarbehandlungsmitteln eingesetzt. In Russland wird die Nerzölemulsion als Kosmetikum und Arzneimittelgrundlage dank ihres reichen Gehaltes an ungesättigten Fettsäureglyceriden, ihres UV-Schutzes, ihrer guten emulgierenden Eigenschaften und hohen Lagerstabilität für die Herstellung von Rezepturen in der Apotheke verwendet. Die Fettsäurezusammensetzung ist: Myristinsäure 3,5 %, Myristoleinsäure 0,6%; Palmitinsäure 16,9 %; Palmitoleinsäure 17,0 %; Stearinsäure 2,0 %; Ölsäure 45,3 %; Linolsäure 14,7 %.

In dieser Studie wird versucht, eine neue Formulierung auf der Basis der Zusammensetzung von Müstella Creme zu entwickeln und mit den bekannten Formulierungen zu vergleichen.

Die Zusammensetzung der in dieser Studie untersuchten Formulierungen ist im Kapitel 3.2.1.2. dargestellt.

4.6.1. „nachgebaute“ Variationen im Vergleich zum Originalprodukt Müstella Creme

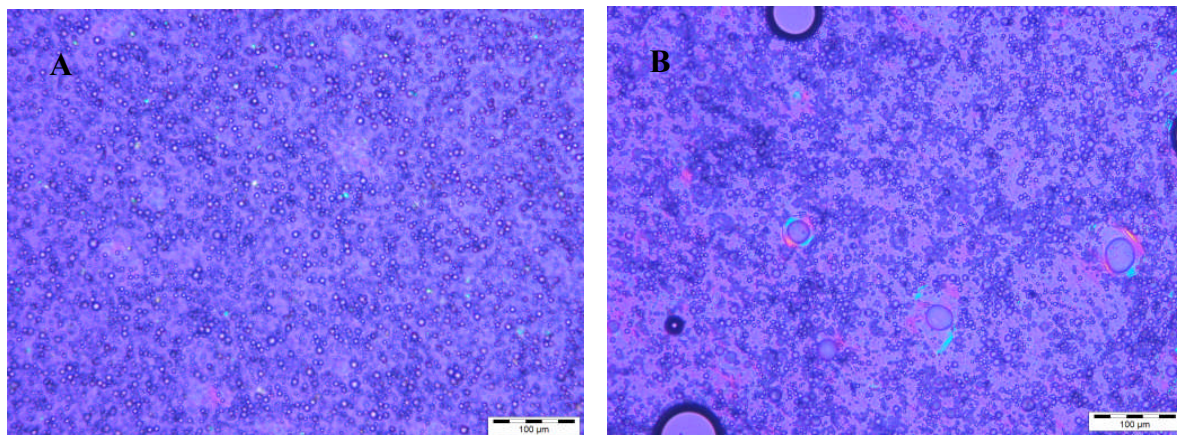


Abbildung 40: Polarisationsmikroskopische Aufnahme: A- Müstella Creme, B – Variation IV (1 Woche nach der Herstellung), Balken 100 µm

Abbildung 40 zeigt polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Originalrezeptur Müstella Creme und der „nachgebauten“ Variation IV (1 Woche nach der Herstellung) im Vergleich. Die Originalrezeptur (Abbildung 40 A) stellt eine O/W Emulsion mit einer homogenen Verteilung der inneren Phase dar. Die Variation IV zeigt eine heterogene Verteilung der Öltropfen im wässrigen Dispersionsmedium. Die anisotropen Erscheinungen am Rande der Öltropfen könnten auf auskristallisierten Emulgierenden Cetylstearylalkohol zurückzuführen sein.

4.6.2. Permeation von BM-17-V aus der Müstella Variation im Vergleich zu Basiscreme DAC und zu Müstella Creme

In Abbildung 41 sind die Permeationskurven von BM aus der Basiscreme DAC, Müstella Creme und der Variation der Müstella Creme (Variation IV) im Vergleich dargestellt. Alle Zubereitungen enthalten 0,1 % BM-17-V. Basiscreme und Müstella Creme zeigen keine Unterschiede im Permeationsverhalten ($0,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach ca. 30 Stunden). Die Permeationskurve von BM aus der Variation IV verläuft wesentlich höher, die Menge an permeiertem BM erreicht nach 30 Stunden Versuchsdauer $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Der Flux, der Tabelle 25 zu entnehmen ist, ist um den Faktor 3,5 höher als bei den bereits genannten Formulierungen.

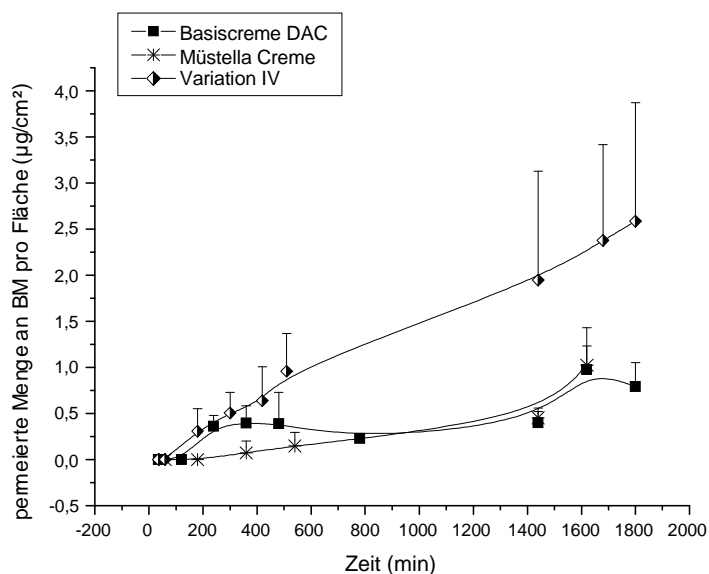


Abbildung 41: Vergleich der Permeation von Betamethason durch SC aus unterschiedlichen Formulierungen mit 0,1% BM-17-V, (Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre)

Tabelle 25: Arzneistoffflux und Flux-Quotient für die Permeation von BM aus 0,1% BM-17-V enthaltenden Zubereitungen durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre (n=4-6)

Formulierung	Betamethason Flux J [g · cm ⁻² · s ⁻¹]	Flux-Quotient $\frac{J_{\text{Zubereitung}}}{J_{\text{Müstella}}}$
Basiscreme DAC	$0,657 \times 10^{-11} \pm 3,1 \times 10^{-12}$	1
Müstella Creme	$0,66 \times 10^{-11} \pm 3,0 \times 10^{-12}$	1
Nachbau IV	$2,33 \times 10^{-11} \pm 1,2 \times 10^{-12}$	3,5

Die zunehmende Teilchengröße in der Variation IV (Abbildung 40 B) führt zur Reduzierung der spezifischen Grenzfläche der Öltropfen. Das kann eine Permeationsabnahme für lipophile Substanzen, die in der inneren Phase gelöst sind, zur Folge haben. Theoretisch müsste daher die Variation IV im Vergleich zur Originalrezeptur hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens wesentlich schlechter sein. Die bessere Permeabilität der Zubereitung kann mit der Zusammensetzung der Grundlage erklärt werden. Möglicherweise kann der Emulgierende Cetylstearylalkohol durch eine Interaktion mit den SC-Lipiden die Permeationsaktivität der Formulierung verbessern.

Abbildung 42 zeigt den Permeationsverlauf von BM aus den hergestellten Zubereitungen Basiscreme DAC, Basiscreme mit einer Kombination von IPA/IPM und Variation IV im Vergleich. Die Permeationskurven unterscheiden sich zum Teil erheblich. Die Variation IV

zeigt die höchsten Permeationswerte (BM-Menge erreicht nach 30 Std. bis zu $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), was um den Faktor 3,5 höher als bei der Basiscreme ist (Tabelle 26). Die Permeationskurve von BM aus der Basiscreme mit jeweils 5 %-igem IPA und IPM Zusatz liegt etwas niedriger, erreicht aber am Ende des Permeationsexperimentes nach ca. 30 Stunden fast den gleichen Wert wie Variation IV. Der Flux, der Tabelle 26 zu entnehmen ist, ist um den Faktor 3,2 höher als bei der Basiscreme ohne Enhancer. Die Permeationskurve aus der Basiscreme DAC verläuft wesentlich flacher. Die Menge an permeiertem BM erreicht nach 30 Stunden den Wert von $0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Die Kombination von IPA und IPM in Basiscreme zeigt einen synergistischen Effekt, wie bereits in Kapitel 4.4.2. beschrieben. Der permeationserhöhende Effekt der Hilfsstoffe kann durch die Verbesserung der Wirkstofflöslichkeit im Vehikel und durch eine Veränderung der SC-Mikrostruktur erklärt werden. Die höhere Permeabilität der Variation IV ist vermutlich auf die Besonderheiten der Formulierung zurückzuführen. Vermutlich können der Emulgierende Cetylstearylalkohol und Ethanol durch eine Interaktion mit den SC-Lipiden die Permeation für BM erhöhen, obwohl ein hoher Ethanol-Gehalt in der Formulierung nicht immer zu einer Permeabilitätszunahme führt [Alberg und Müller-Goymann, 1999]. Alberg und Müller-Goymann (1999) haben festgestellt, dass die Wasserhaltige Hydrophile Salbe mit Ethanol-Zusatz die gleiche Permeabilität wie die Zubereitung ohne Enhancer für Hydrocortison-21-acetat zeigte.

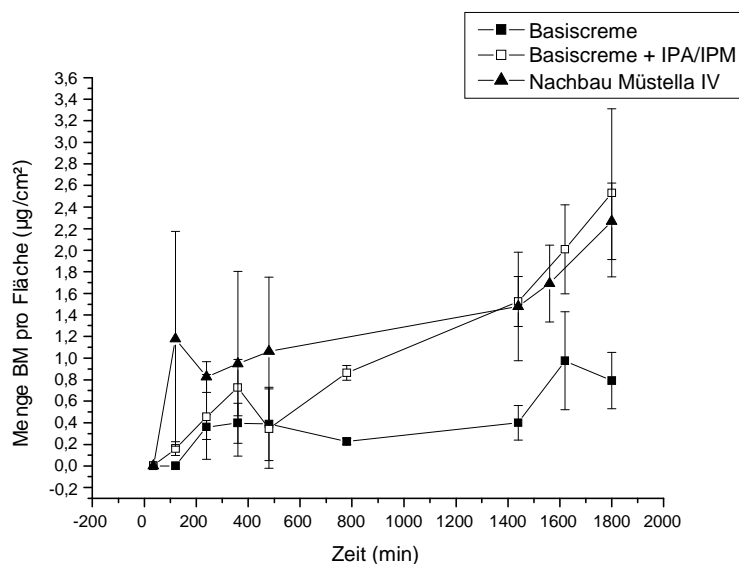


Abbildung 42: Permeation von BM durch exzidiertes SC aus unterschiedlichen Formulierungen mit 0,1% BM-17-V (Spender, weiblich, Abdomen 71 Jahre)

Tabelle 26: Arzneistoffflux und Flux-Quotient für die Permeation von BM aus 0,1% BM-17-V enthaltenden Zubereitungen durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre (n=6-9), *p<0,05, Zubereitungen wurden mit Basiscreme DAC verglichen

Formulierung	Betamethason Flux J [g · cm ⁻² · s ⁻¹]	Flux-Quotient $\frac{J_{\text{Zubereitung}}}{J_{\text{Basiscreme}}}$
Basiscreme DAC	$0,657 \times 10^{-11} \pm 3,1 \times 10^{-12}$	1
Basiscreme DAC + IPA/IPM*	$2,08 \times 10^{-11} \pm 7,2 \times 10^{-12}$	3,2
Nachbau IV*	$2,33 \times 10^{-11} \pm 1,2 \times 10^{-12}$	3,5

4.6.3. Einfluss von Isopropylalkohol und Isopropylmyristat auf das Permeationsverhalten von BM-17-V aus einer Nerzölemulsion

In Abbildung 43 werden die Permeationskurven von BM aus der Variation IV mit und ohne IPM/IPA im Vergleich dargestellt. Die beiden Kurven stimmen überein. Der Flux, der Tabelle 27 zu entnehmen ist, ist bei beiden Formulierungen ebenfalls ähnlich. Aus diesem Ergebnis ist abzuleiten, dass beide Hilfsstoffe keinen Einfluss auf die Löslichkeit von BM-17-V in der Zubereitung haben und keine weitere Veränderung der SC-Mikrostruktur hervorrufen. Vermutlich ist die Konzentration der Hilfsstoffe in dieser Rezeptur noch zu gering, um einen zusätzlichen Effekt zu bewirken. Die Zubereitung enthält Ethanol und Tryglyceride von Fettsäuren. Vermutlich wirken bereits diese Komponenten synergistisch, so dass ein zusätzlicher Effekt von IPA und IPM nicht bemerkbar wird.

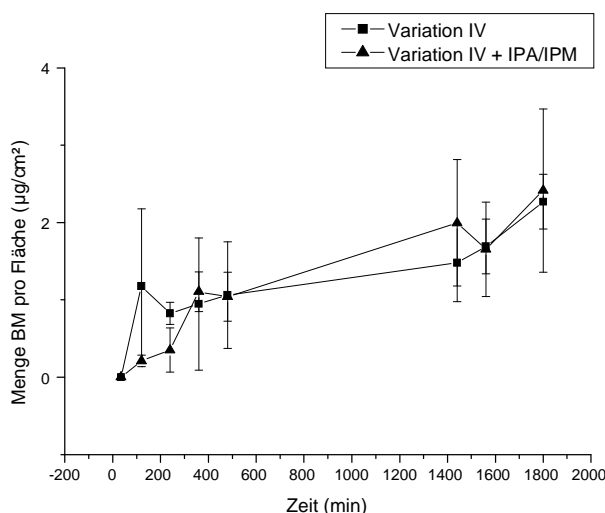


Abbildung 43: Permeation von BM aus der Variation IV mit und ohne Enhancer (Spender: Abdomen, weiblich, 71 Jahre), 0,1 % BM-17-V

Tabelle 27: Arzneistoffflux für die Permeation von BM aus 0,1% BM-17-V enthaltenden Zubereitungen durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre (n=4-6), *p<0,05 Variation IV + IPA/PM verglichen mit Variation IV

Formulierung	Betamethason Flux J [g · cm ⁻² · s ⁻¹]
Variation IV	$1,33 \times 10^{-11} \pm 1,4 \times 10^{-12}$
Variation IV + IPA/PM	$1,93 \times 10^{-11} \pm 8,7 \times 10^{-12}$

In dieser Arbeit wurde zusätzlich eine Kombination von Propylenglykol und DMSO in der Nerzölemulsion für BM-17-V untersucht. Überraschenderweise konnte keine Permeation von BM bzw. BM-17-V durch SC nachgewiesen werden. Jiang und Wang (2004) haben einen synergistischen Effekt für diese Kombination festgestellt und konnte diesen Effekt mit einer Hypothese erklären. Laut ihrer Meinung könnte Ölsäure eine Desorganisation der Lipidpackung des SC fördern und zusätzlich als ein Träger für DMSO dienen. Die mit DMSO ausgefüllten Hohlräume im SC könnten eine Penetration der lipophilen Substanzen fördern. Für BM-17-V wird diese Kombination als permeationshemmend eingestuft. Offensichtlich hat Propylenglykol die Wirkstofflöslichkeit verschlechtert und damit eine Permeationsabnahme von BM zur Folge. Der Befund einer Permeationsreduzierung durch Propylenglykol wurde in der Literatur bereits beschrieben [Alberg, 1998].

4.6.4. DSC-Untersuchung des exzidierten humanen Stratum corneum

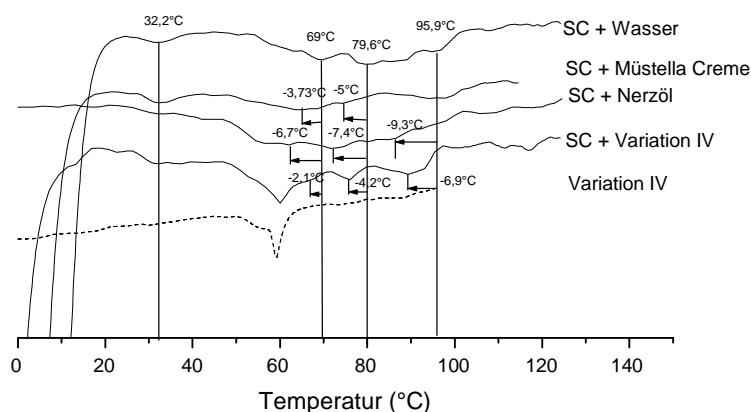


Abbildung 44: DSC-Thermogramme von Stratum corneum, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre

Tabelle 28: Phasenübergangstemperaturen von humanem SC, unbehandelt und behandelt mit unterschiedlichen Grundlagen, Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre

Stratum corneum behandelt mit	T1 (°C)	T2 (°C)	T3 (°C)	T4 (°C)
Wasser	32,2	69	79,6	95,9
Müstella Creme	32,2	65,27	74,61	95,9
Variation IV	32,2	66,9	75,4	89
Nerzöl	32,2	62,34	72,2	86,6

Abbildung 44 zeigt DSC-Thermogramme des hydratisierten und mit unterschiedlichen Grundlagen behandelten SC: Müstella Creme, Variation IV und Nerzöl. Das hydratisierte Stratum corneum (100 % Wassergehalt) zeigt vier Phasenübergänge bei 32,2 °C (T1), 69 °C (T2), 79,6 °C (T3) und 95,9 °C (T4) (Tabelle 28). Die Behandlung des SC mit Müstella Creme führt zu einer Verschiebung von Peak (T2) um 3,73 °C und Peak (T3) um 4,99 °C zu niedrigeren Temperaturen, was auf eine Verflüssigung der Lipide schließen lässt. Die Lage der Peaks T1 und T4 bleibt unverändert. Diese Veränderung kann nicht allein mit dem reinen Wassereffekt erklärt werden, weil die Zubereitung (85 % wässrige Phase) im Stande ist, weitere Veränderungen der gequollenen Keratinfibrillen im hydratisierten SC zu ermöglichen. Das reine Nerzöl führt zur Veränderung der SC-Lipidstruktur, weil es nach der Behandlung des SC zur Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen T2 um 6,7 °C und T3 um 7,4 °C kommt. Die Behandlung des SC mit der Variation IV zeigt auch einen Effekt auf die Lipidstruktur. Es kommt zu einer deutlichen Verschiebung der Phasenumwandlungen T3 um 4,2 °C und T4 um 6,9 °C zu niedrigeren Temperaturen. Die Lage des Peaks T1 bleibt unverändert, die Verschiebung des Peaks T2 kann laut [Leopold und Lippold, 1995a] als nicht signifikante Verschiebung betrachtet werden. Offensichtlich führt die Variation IV zur leichten Verflüssigung der Lipide und der Veränderung der Proteine im SC laut [Bouwstra et al., 1991a] oder laut [Silva et al., 2006] zur Desorganisation der hoch geordneten Lipidassoziate. Diese Verschiebungen können einer Interaktion des Emulgierenden Cetystearylalkohols oder des Nerzöls mit den SC-Lipiden entsprechen. Der zusätzliche Peak in der Variation IV bei 60 °C entspricht dem Emulgierenden Cetylstearylalkohol.

Allerdings deuten die DSC-Daten nur auf die Veränderung der Lipidstruktur und diese Veränderung muss nicht unbedingt einer Permeationserhöhung entsprechen. Wie in Kapitel 4.4 am Beispiel von IPM beschrieben wurde, führte auch IPM zu deutlichen Verschiebungen

der Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen. Gleichzeitig wurde IPM als penetrationshemmender Hilfsstoff eingestuft.

4.6.5. WAXD-Untersuchung

Durch die WAXD Untersuchungen kann bestimmt werden, ob die Lipide im SC als Flüssigkeit, Gel (hexagonal) oder Kristalle (orthohombische) angeordnet sind und ob es bei der Behandlung mit den Zubereitungen zur Veränderung der Netzebeneabstände zwischen den polaren Kopfgruppen der Lipide kommt. Tabelle 29 zeigt die Gitternahordnungsabstände der Lipidpackung des unbehandelten und mit unterschiedlichen Grundlagen behandelten SC. Die WAXD-Daten zeigen, dass die Behandlung des SC mit den Zubereitungen zu keiner Veränderung der Netzebenenabstände führt. Müstella Creme und Variation IV zeigen eine Interferenz bei 0,411 nm. Aufgrund der polarisationmikroskopischen Textur konnte auf eine hexagonale Struktur der Zubereitungen geschlossen werden. Da Cetiol als Bestandteil von Müstella Creme röntgenamorph ist, kann die Interferenz bei 0,4112 nm nicht diesem Bestandteil zugeordnet werden.

Tabelle 29: Röntgenweitwinkelinterferenzen [nm] von unbehandeltem Stratum corneum im Vergleich mit vorbehandeltem Gewebe (Spender: weibl., 71 Jahre, Abdomen.)

		nm	nm
SC		0,3766	0,4135
SC + Variation IV		0,3766	0,4135
SC + Müstella Creme		0,3766	0,4135
Müstella Creme	0,2093 (diffus)	0,3256 (diffus)	0,4112
Variation IV	-	-	0,4112
Cetiol-V	-	-	-

4.6.6. Permeation von Hydrokortison aus kommerziellen Produkten im Vergleich

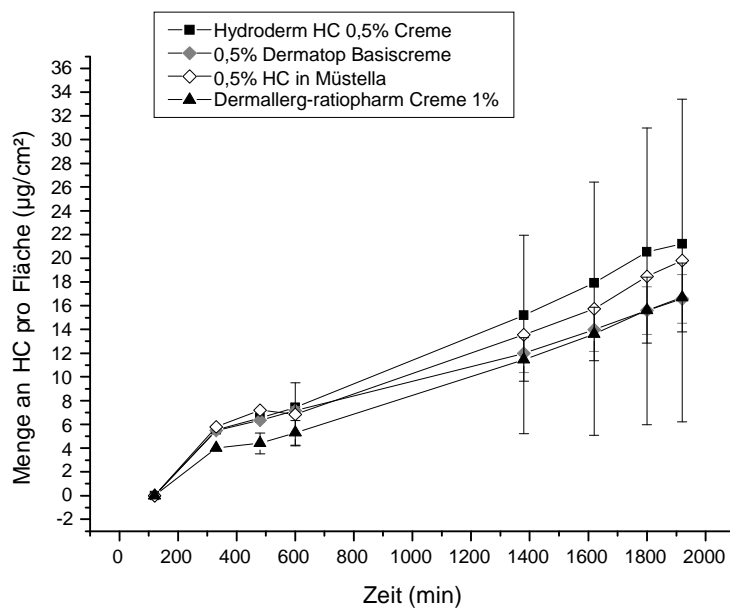


Abbildung 45 Permeation von Hydrokortison aus verschiedenen Fertigarzneimitteln und aus der Mütella Creme (Spender: Abdomen, weiblich, 71 Jahre)

Tabelle 30: Arzneistoffflux für die Permeation von Hydrokortison Zubereitungen durch exzidiertes Stratum corneum. Spender: weiblich, Abdomen, 71 Jahre (n=6-9)

Formulierung	Hydrokortison Flux J [g · cm ⁻² · s ⁻¹]
Hydroderm HC 0,5 % Creme	$1,812 \times 10^{-10} \pm 1,1 \times 10^{-11}$
Dermatop basiscreme HC 0,5 %	$1,31 \times 10^{-10} \pm 2,2 \times 10^{-11}$
0,5 % HC in Mütella	$1,7 \times 10^{-10} \pm 1,1 \times 10^{-11}$
Dermallerg-ratiopharm Creme 0,1 % HC	$1,45 \times 10^{-10} \pm 2,2 \times 10^{-11}$

In Abbildung 45 werden die Präparate: Hydroderm HC Creme, Dermatop-Basiscreme, Mütella Creme, Dermallerg-ratiopharm Creme hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens im Bezug auf Hydrokortison untersucht. Die Permeationskurven weichen geringfügig voneinander ab. Die Zunahme der Hydrokortisonkonzentration erfolgt nahezu linear. Alle untersuchten Fertigarzneimittel sind mikroskopisch als Suspensionsformulierungen einzuordnen, eine Bestimmung der Sättigungskonzentration des Wirkstoffes in den Formulierungen war nicht möglich, da keine Placeboformulierungen zur Verfügung standen.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen mit den bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen in Übereinstimmung [Refai und Müller-Goymann, 1999; Brinkmann, 2006]. Der wichtigste Parameter, der für den Transport des Wirkstoffes durch das SC verantwortlich ist, ist seine Sättigungskonzentration im SC, welche substanzspezifisch ist. Die Sättigungskonzentration des Wirkstoffes im Vehikel spielt solange keine Rolle, wie eine ausreichende, gelöste Substanzmenge zur Aufsättigung der Barriere vorhanden ist.

4.6.7. Zusammenfassende Diskussion über Nerzöl in Dermatika

Es wurden Permeationsuntersuchungen von BM-17-V aus verschiedenen Zubereitungen durchgeführt. Im Laufe der Permeationsuntersuchungen wurde folgendes festgestellt:

Bei einem Vergleich der halbfesten Zubereitungen Soventol® Creme, Thermogel und Müstella Creme, blieb die Soventol® Creme mit einer hohen Permeabilität die beste Grundlage für BM-17-V, ihre höchste Permeationsaktivität konnte mit den kombinierten Permeationsförderern IPA und IPM in Zusammenhang gebracht werden. Die Hilfsstoffe zeigten einen synergistischen Effekt. In Kombination führten beide Hilfsstoffe zur Veränderung der SC-Mikrostruktur [Refai, 2001], sie führten nicht nur zur Desorganisation der Lipidstruktur durch eine Verflüssigung der Lipide, sondern sie förderten eine Bildung neugeordneter Lipidstrukturen, welche einen Anstieg der Permeation hervorrufen könnte. Thermogel zeigte für BM-17-V eine etwas niedrigere Potenz im Vergleich zur Soventol® Creme. Die Zubereitung enthielt nur IPA als Penetrationsenhancer. IPA hat die Wirkstofflöslichkeit wesentlich verbessert, so dass eine Lösungssalbe resultierte, und hat die Veränderung der SC-Mikrostruktur gefördert. IPA hat eine Aufweitung der Lipidketten ermöglicht. Jedoch ergaben diese erweiterten Wege keine optimale Permeation der lipophilen Substanzen wie BM. Müstella Creme zeigte im Vergleich zu den bereits genannten Zubereitungen die schlechteste Permeationsaktivität, zeigte dafür identische Permeabilitätseigenschaften wie die Basiscreme DAC im Hinblick auf BM-17-V. Im Hinblick auf Hydrokortison zeigte Müstella Creme die gleiche Permeabilität wie die kommerziellen Produkte Hydroderm HC Creme, Dermatop-Basiscreme, Dermallerg-ratiopharm Creme.

Im Laufe der Arbeit wurde eine neue Zubereitung Variation IV der Müstella Creme entwickelt. Sie zeigte im Vergleich zum Originalprodukt und zur Basiscreme DAC eine wesentlich höhere Permeabilität.

Die zusätzliche Zugabe einer Kombination von Propylenglykol und DMSO zur Grundlage der Variation IV verschlechterte die Permeation für BM im Vergleich zur Arzneistoffpermeation aus Variation IV ohne Zusätze, Isopropylalkohol und Isopropylmyristat übten keinen Einfluss aus. Der letzt genannte Befund wich von den bereits in der Literatur beschriebenen

Ergebnissen ab [Brinkmann und Müller-Goymann, 2003], welche einen synergistischen Effekt für die Kombination aus IPA und IPM beschrieben. Das konnte mit der Zusammensetzung der Variation IV erklärt werden. Die Zubereitung enthielt einen Alkohol – Ethanol und eine Mischung aus Triglyceriden von Fettsäuren. Diese Kombination konnte auch einen synergistischen Effekt zeigen, der wesentlich höher als die Permeationsaktivität einer Zubereitung war, in welcher nur die einzelnen Komponenten eingearbeitet waren. Dieser Effekt auf das SC war relativ stark, so dass sich kein weiterer Effekt der anderen Enhancer, gegenüber IPA und IPM bemerkbar machen konnte. Wenn man den Flux J der Variation IV mit dem Fertigarzneimittel vergleicht, ergibt sich folgende Rangordnung:

Vergleich aller Formulierungen ohne IPA/IPM-Zusatz in Bezug auf Flux J:

Variation IV > Basiscreme DAC > Soderma Salbe®, Wollwachsalkoholsalbe, Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe.

Die permeationsverbessernden Eigenschaften der Variation IV wurden mit Hilfe von DSC-Untersuchungen gestützt. Durch einen denaturierenden Effekt auf die Lipid-Protein-Komplexe und Proteine innerhalb der Korneozyten konnten die Barriereigenschaften des SC wesentlich schwächer werden und damit eine Permeationszunahme von BM bewirken.

Vergleich aller Formulierungen mit IPA/IPM-Zusatz in Bezug auf Flux J:

Soventol® Creme > Wollwachsalkoholsalbe mit IPA/IPM > Thermogel > Variation IV mit IPA/IPM bzw. ohne > Basiscreme DAC mit IPA/IPM

Da die Variation IV eine höhere Permeabilität im Vergleich zu den BM-17-V-haltigen Fertigarzneimitteln und einigen DAB und DAC- Grundlagen besitzt, könnte Variation IV für die Herstellung BM-17-V-haltiger Formulierungen eingesetzt werden.

4.7. Permeationsuntersuchung durch organotypische Hautäquivalente

Als Alternative zum Stratum corneum wurden organotypische Hautäquivalente, kurz ASC (artificial skin constructs) untersucht. Die ASC stammten aus dem institutseigenen Zellkulturlabor TU Braunschweig. Die Barriereigenschaften der ASC gelten im Vergleich zum humanen Stratum corneum als nicht sehr stark ausgeprägt, was als gute Voraussetzung für eine leichte Permeation hydrophiler Substanzen zu sehen ist. In der Literatur wurden Permeationskoeffizienten für mehrere Substanzen aus verschiedenen Zubereitungen verglichen und die Unterschiede quantifiziert [Kriwet und Parenteau, 1996; Schmook et al., 2001; Specht et al., 1998; Hoffmann und Müller-Goymann, 2005; Winkler und Müller-

Goymann, 2005]. Bei der Permeation durch humanes Stratum corneum und durch ein Hautkonstrukt konnte die gleiche Rangfolge der permeierenden Wirkstoffe bestimmt werden [Specht et al., 1998]. Andere Studien zeigten, dass rekonstruierte Hautmodelle generell nicht als Alternative für Stratum corneum geeignet sind [Schmook et al., 2001]. Nichtsdestotrotz wurden Hautäquivalente als Alternative zu SC vorgeschlagen, da diese unabhängig von Alter, Geschlecht und Entnahmestelle des SC sind. Die Permeationsdaten durch SC können nur bei gleichem Spender miteinander verglichen werden. Für die Evaluierung der ASC wurden für die Permeationsuntersuchungen unterschiedliche Zubereitungen mit dem lipophilen Kortikosteroid BM-17-V ausgewählt. Die kommerziellen Produkte: Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe und die Grundlagen WS und Basiscreme DAC wurden in diesem Experiment untersucht und die Ergebnisse mit den Permeationsdaten durch Stratum corneum verglichen.

4.7.1. Permeation von BM-17-V aus dermalen Zubereitungen durch SC und Hautäquivalente im Vergleich

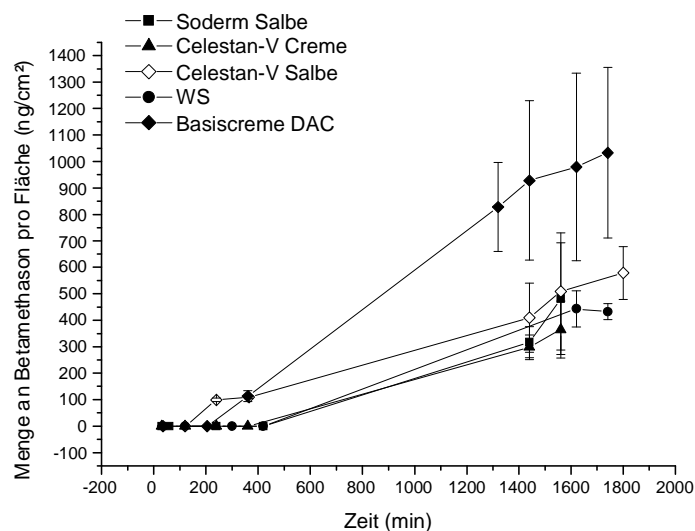


Abbildung 46: Permeation von BM durch SC aus unterschiedlichen Zubereitungen mit 0,1% BM-17-V, Spender (Abdomen, weiblich, 69 Jahre)

Abbildung 46 zeigt den Permeationsverlauf von BM durch SC aus Celestan-V® Salbe, Celestan-V® Creme, Soderm® Salbe, WS, Basiscreme DAC im Vergleich. WS und die FAM zeigen ein nahezu übereinstimmendes Permeationsverhalten. Der letztgenannte Befund wurde in der Literatur bereits für HC beschrieben [Refai und Müller-Goymann, 2002]. Die Permeationskurve aus der Basiscreme verläuft jedoch wesentlich steiler. Das kann durch einen penetrationsfördernden Effekt des Wassers erklärt werden. Wasser kann durch

Desorganisation der Lipidpackung des SC eine Permeationszunahme für einige Substanzen zur Folge haben [Bouwstra et al., 1991a]. Die bessere Permeabilität kann auch durch den emulgierenden Cetylstearylalkohol und Propylenglykol (PG) erklärt werden, die durch eine Interaktion mit den SC-Lipiden die Permeation für BM erhöhen könnten. Viele Autoren haben PG als Enhancer eingestuft [Barry und Bennet, 1987; Bouwstra et al., 1989; Cornwell et al., 1994; Williams and Barry, 2004]. Sein möglicher Wirkmechanismus der Penetrationserhöhung wurde mit Hilfe röntgenographischer Hautstrukturanalysen erklärt [Bouwstra et al., 1991a,b; Brinkmann und Müller-Goymann, 2005].

In Abbildung 47 sind die Permeationskurven von BM aus den gleichen Zubereitungen durch die Hautkonstrukte im Vergleich dargestellt. Die Kurven zeigen zum Teil erhebliche Unterschiede im Permeationsverlauf. Die höchste Permeationsrate zeigt die Wollwachsalkoholsalbe. Die Menge an permeiertem BM erreicht nach 30 Stunden $4,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die Permeationsraten durch ASC sind bis um das 10-fache höher als bei der Arzneistoffpermeation durch Stratum corneum. Das liegt vermutlich an der erhöhten Durchlässigkeit und erhöhten Hydrophilie des Hautkonstrukts. Die Permeationskurven von BM aus Celestan-V® Creme und Basiscreme DAC verlaufen etwas flacher. Die Permeationsraten erreichen nach 30 Stunden eine Konzentration von $4-4,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, welche um das 13-fache höher als bei der Permeation durch Stratum corneum sind. Die Cremes zeigen zueinander keine erheblichen Unterschiede im Permeationsverlauf, da beide Grundlagen einen hohen Wasseranteil enthalten (40-70 % m/m) und beide O/W Systeme darstellen. Soderm® Salbe besitzt im Hinblick auf BM-17-V eine wesentlich geringere Permeabilität ($3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach ca. 30 Stunden) im Vergleich zu WS, obwohl beide Zubereitungen eine ähnliche Zusammensetzung haben und bei der SC-Permeation bei diesen Formulierungen keine Unterschiede nachgewiesen wurden. Celestan-V® Salbe zeigt das niedrigste Permeationspotential ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 30 Stunden). Die Salbe enthält einen hohen Anteil an Vaseline und Paraffin, die die Löslichkeit des Wirkstoffes im Vehikel und damit den Diffusionskoeffizienten für BM-17-V wesentlich reduzieren könnten.

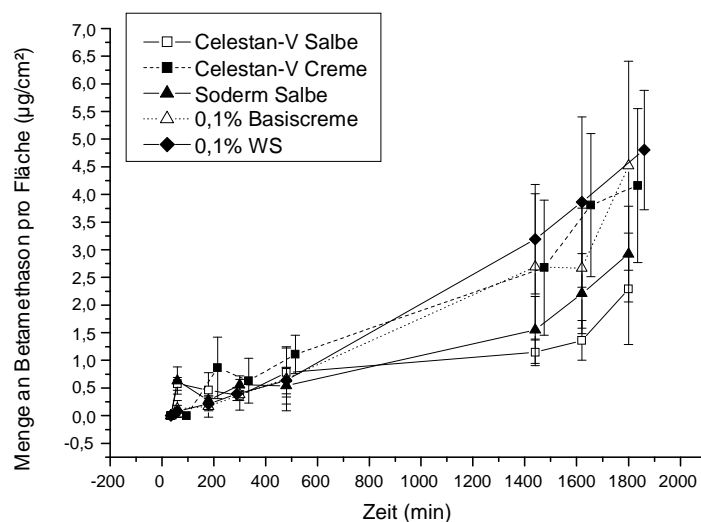


Abbildung 47: Permeation von BM durch ASC aus BM-17-V-haltigen Systemen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,1%: Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe, Soderm® Salbe, Basiscreme, WS; n=4-6

Da die organotypischen Hautäquivalente eine höhere enzymatische Aktivität als Stratum corneum und geringere Barriereigenschaften als SC besitzen, permeieren im Laufe der Permeationsuntersuchung nicht nur das Hydrolyseprodukt (BM), sondern ein weiteres Abbauprodukt, 9 α -Fluorprednisolon, und auch der nichtabgebaute Wirkstoff (BM-17-V).

In Abbildung 48 sind die Permeationskurven für die Summe aller permeierten Kortikosteroide aus den gleichen Zubereitungen durch ASC im Vergleich dargestellt. Es ist die gleiche Gesetzmäßigkeit in der Permeationsreihenfolge wie in Abbildung 47 zu erkennen. Die höchste Permeation für den Wirkstoff zeigen die Grundlagen WS und Basiscreme DAC (8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 30 Stunden). Celestan-V® Creme repräsentiert die mittleren Permeationswerte (4,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 30 Stunden). Die niedrigsten Werte zeigen die Fertigarzneimittel Soderm® Salbe und Celestan-V® Salbe (4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 30 Stunden).

Wenn man die Flux-Daten aller Formulierungen (Tabelle 31) miteinander vergleicht, lässt sich sagen, dass die selbsthergestellten Zubereitungen, die Salbe WS und die Basiscreme DAC, einen ähnlichen Flux haben, der um den Faktor 1,3 höher ist als der der Celestan-V® Creme, um den Faktor 2,8 höher als der der Celestan-V® Salbe und um den Faktor 2,9 höher als der der Soderm® Salbe. Auf der Basis der Flux-Daten zeigt die Permeation durch ASC nur teilweise die gleiche Reihenfolge im Vergleich zur Permeation durch das SC, was auf eine eingeschränkte Eignung des Hautkonstrukts als Ersatz für SC schließen lassen könnte. Bei der SC-Permeation sinken die Fluxwerte in der Reihenfolge Basiscreme > Celestan-V® Salbe = Soderm® Salbe = WS = Celestan-V® Creme. Bei der ASC-Permeation sinken die Fluxwerte in der Reihenfolge: Basiscreme = WS > Celestan-V® Creme = Celestan-V® Salbe = Soderm® Salbe. Die

Grundlage Basiscreme hat in beiden Fällen die beste Permeabilität im Hinblick auf BM gezeigt, der Fluxunterschied ASC/SC ist Faktor 6 (Tabelle 32). Die FAM Celestan-V® Salbe und Soderm® Salbe zeigen eine sehr ähnliche Permeation sowohl durch das SC als auch durch das Hautkonstrukt, der Fluxunterschied ASC/SC ist in beiden Fällen Faktor 4,7 bzw 4,5. Für die Celestan-V® Creme ist der Fluxunterschied ASC/SC etwas höher Faktor 12,4(Tabelle 32). Das kann durch eine hohe Hydrophilie der Zubereitung (70 % wässrige Phase) und damit durch eine hohe Affinität zum Hautkonstrukt erklärt werden. Der relativ hohe Flux-Quotient ASC/SC - 12,5 für WS kann durch den Okklusionseffekt erklärt werden.

Werden die Permeationen miteinander verglichen, die mit Stratum corneum und ASC ermittelt wurden, ist die Menge an permeiertem BM durch die ASC gegenüber Stratum corneum für die hydrophilen Grundlagen deutlich gesteigert.

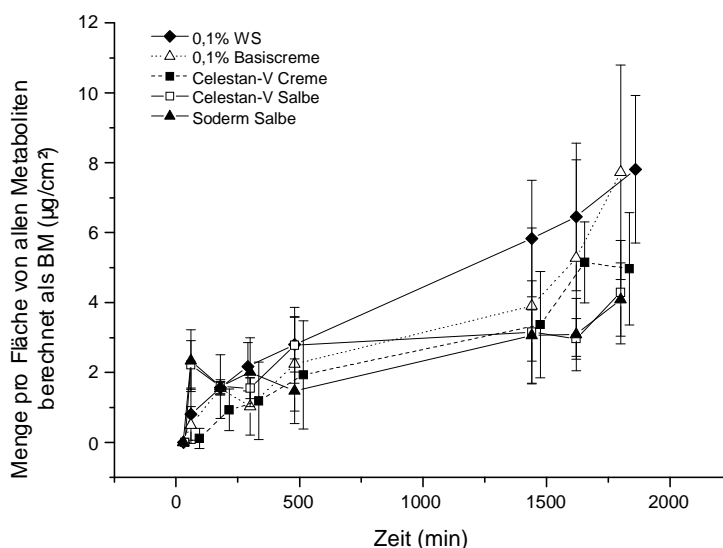


Abbildung 48: Permeation von summiertem BM-17-V, BM und 9α-Fluorprednisolon durch ASC aus 0,1% BM-17-V haltigen Systemen : Celestan-V® Creme, Celestan-V® Salbe, Soderm® Salbe, WS, Basiscreme DAC; n=4-6

Tabelle 31: Arzneistoffflux für die Permeation von BM-17-V und BM summiert als BM aus 0,1%-igen BM-17-V Formulierungen durch SC und ASC; Mittelwert \pm SD (n=6)

Zubereitung	Flux J [$\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] Stratum corneum, Faktor 1×10^{-12}	Flux J [$\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] ASC, Faktor 1×10^{-11}
Soderm Salbe	4.92 ± 1.6	$2,31 \pm 1,0$
Celestan-V Salbe	5.35 ± 2.6	2.42 ± 1.35
Celestan-V Creme	4.05 ± 0.9	5.02 ± 0.62
Wollwachsalkoholsalbe	4.82 ± 0.38	6.01 ± 1.5
Basiscreme DAC	11.2 ± 1.3	6.74 ± 2.6

4.7.2. Zusammenfassende Diskussion für die Permeation von BM-17-V durch Hautäquivalente ASC

Im Vergleich zu Stratum corneum besitzen ASC nur schwach ausgeprägte Barriereigenschaften. Deswegen erfolgte zu Beginn der Untersuchung eine sehr schnelle Wirkstoffpermeation ohne Lag-Zeit, während bei der SC-Permeation der Wirkstoff im Akzeptormedium erst nach 12 Stunden nachweisbar war. Die Menge an permeiertem Arzneistoff und der Flux durch das Stratum corneum bzw. durch das Hautäquivalent haben deutliche Unterschiede gezeigt. Dieser Unterschied war jedoch bei anderen Autoren wesentlich größer. Bei Winkler und Müller-Goymann (2005) lag der Unterschied der Permeationskoeffizienten für ALA-HCl (5-Aminolävulinsäure) aus einer lipophilen Grundlage bei Faktor 64 (ASC/SC), für ABE (ALA-n-butylester) bei Faktor 142. Für die Permeation der gleichen Wirkstoffe aus hydrophilen Grundlagen lag der Unterschied bei einem Faktor von 860-2800. Bei Specht (1999) lag der Unterschied der Permeationskoeffizienten für Ibuprofen bei Faktor 20, für Hydrocortisonacetat aus Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe (WHS) bei einem Faktor von 17. Offensichtlich ist dieser Unterschied von der Lipophilie des Arzneistoffes abhängig. Je hydrophiler die Substanz ist, desto schneller wird diese durch ASC permeieren. Im Laufe der Arbeit wurde die Permeation von BM-17-V aus unterschiedlichen Zubereitungen untersucht. Bei Verwendung einer hydrophilen Grundlage für BM-17-V beträgt der Unterschied Faktor 6 bis ca. 12,4. Für die lipophilen Grundlagen liegen die Steigerungen im Bereich von Faktor 4,5 bis ca. 12,5 (Tabelle 32). Offensichtlich wurden die Entwicklungsbedingungen der Hautzellen *in vitro* nicht perfekt nachgeahmt. Bei den Hautkonstrukten wurde eine entsprechende Lipidmatrix und eine dichte Hornschicht aus verhornten Korneozyten nicht erreicht. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Winkler und Müller-Goymann (2002), oder mit den früher beschriebenen Literaturdaten über

Living Skin Equivalent [Ernesti et al., 1992] überein. Wie sich herausgestellt hat, sind die rheologischen Eigenschaften des Donators ebenfalls für die Permeationsunterschiede von Einfluss. Die Quotienten der ASC/SC Permeationsdaten werden durch Unterschiede in den rheologischen Eigenschaften der Vehikel, deren Spreitvermögen und der Wirkstofffreisetzung mit beeinflusst.

Tabelle 32: Vergleich der permeierten Wirkstoffmenge und Fluxes für BM aus unterschiedlichen Zubereitungen (0,1% BM-17-V) durch ASC und durch Stratum corneum

	Perm. Menge an BM $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ SC	Perm. Menge an Σ BM, BM17V ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ASC	Quotient perm.Menge ASC/SC	Quotient $\frac{J_{ASC}}{J_{SC}}$
0,1% WS	0,45	8	20	12,5
0,1% Basiscreme	1,0	8	8	6
Celestan-V® Creme	0,35	5	14	12,4
Celestan-V® Salbe	0,55	4	7,3	4,5
Soderm® Salbe	0,5	4	8	4,7

In dieser Arbeit wurde erneut gezeigt, dass der Einsatz von Hautmodellen als 1:1 Ersatz für humane SC-Exzidate nicht rational ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die Literaturdaten [Schmook et al, 2001]. Andererseits ist eine solche Aussage zu relativieren, weil frühere Literaturdaten gezeigt haben, dass Hautäquivalente bei einigen Substanzen die gleiche Reihenfolge bei den Permeationsdaten wie mit der exzidierten humanen Hornhaut aufweisen [Specht et al., 1998; Winkler und Müller-Goymann, 2002]. Das Hautmodell stellt dann eine Alternative zur humanen Haut dar, wenn mit dessen Hilfe die dermale Verfügbarkeit verschiedener Substanzen in der gleichen Grundlage bestimmt wird, weil die Permeationsdaten nicht nur von den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Arzneistoffe sondern stark von der Zubereitung beeinflusst werden.

4.8. Wirkstoffmetabolisierung

4.8.1. Metabolisierung von BM-17-V bei unterschiedlichen pH-Werten mit und ohne Hautkonstrukte

Organotypische Hautäquivalente werden z.B. für Metabolisierungsstudien eingesetzt, um auf diese Weise *in vitro* Rückschlüsse auf das Verhalten des Wirkstoffes *in vivo* ziehen zu können. *In vitro* Studien mit Haut oder Hautäquivalenten liefern Hinweise, wie die Biotransformation topisch applizierter Substanzen in der Haut nach Penetration in die Haut erfolgt [Kao et al., 1985]. Hautäquivalente für diesen Zweck wurden als nützliches Ersatzmodell für Haut von Slivka [Slivka et al., 1993; Slivka, 1992] vorgeschlagen. Ernesti et al. (1992) konnten zeigen, dass 50 % topisch applizierten Testosterons nach Durchtritt durch das Hautäquivalent metabolisiert wurde, wobei das Metabolitenspektrum dem von exzidiierter humaner Vollhaut entsprach. Der Metabolismus ist von den physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes und den metabolischen Ressourcen der Haut (z.B. Enzymgehalt) abhängig.

In diesem Kapitel wird am Beispiel des Glukokortikoids BM-17-V das Metabolisierungspotenzial des organotypischen Hautäquivalents (ASC) diskutiert. Darüber hinaus wird versucht, eine Evaluierung der ASC als Ersatzmodell für Stratum corneum durchzuführen. Außerdem wird die enzymatische Aktivität der ASC bei unterschiedlichen pH-Werten überprüft.

BM-17-V ist ein instabiles Glukokortikoid, das wie andere Monoester (z.B. Hydrokortisonacetat, Prednisolonacetat) die Tendenz zeigt, die funktionelle Gruppe in der Position C17 abzuspalten und ein -21 Derivat zu bilden [Anderson und Taphouse, 1981; Bundgaard und Hansen, 1981; Cheung et al., 1985; Gardi et al., 1963; Montenegro et al., 1996; Nakano et al., 1981]. Man unterscheidet zwei Stadien beim Abbau von BM-17-V. Der erste Schritt ist eine Transformation in ein -21-Derivat, der zweite ist eine Hydrolyse des 21-Derivats in BM [Po et al., 1979].

4.8.1.1. Stabilität von BM-17-V bei pH 4,5, 37°C

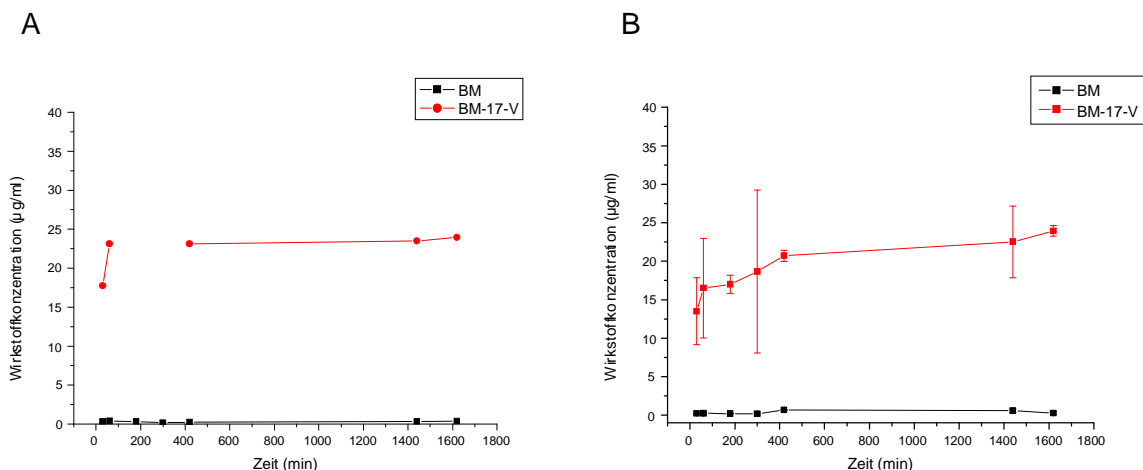


Abbildung 49: Stabilität von BM-17-V in Pufferlösung, pH 4,5 bei 37°C, A) ohne ASC; B) mit ASC

In Abbildung 49 ist die Konzentrationsänderung von BM-17-V (µg/ml) in Abhängigkeit von der Zeit (min) bei pH 4,5 mit und ohne ASC dargestellt. Der Wirkstoff wurde in die Lösung in einer Konzentration von 25 µg/ml eingebracht. Die Konzentration von BM-17-V blieb über 30 Stunden unverändert. Die organotypischen Hautäquivalente besitzen bei diesem pH Wert keine enzymatische Aktivität und die Wirkstoffkonzentration bleibt daher unverändert.

4.8.1.2. Stabilität von BM-17-V bei pH 5,5, 37°C

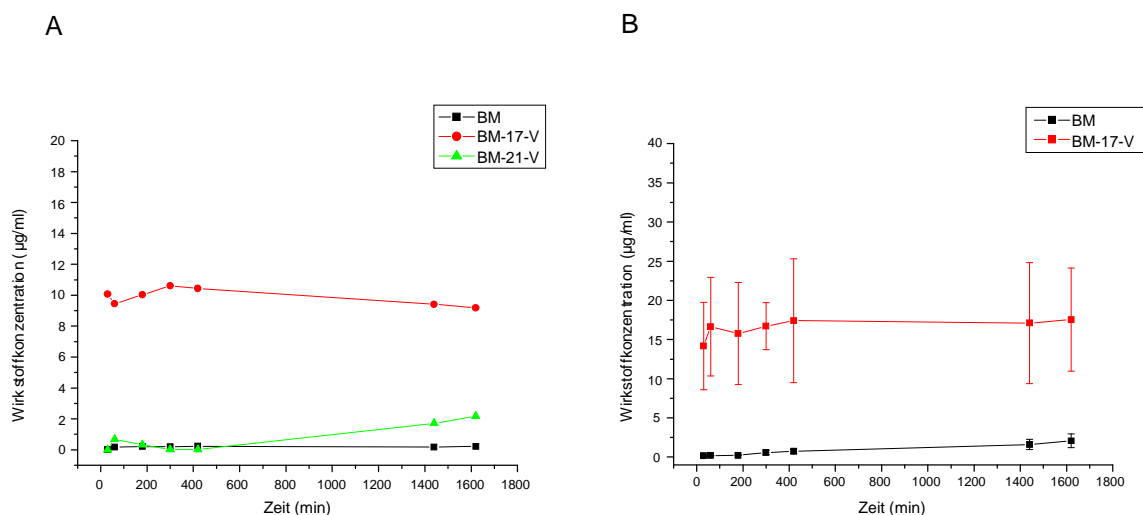


Abbildung 50: Stabilität von BM-17-V in Phosphatpufferlösung, pH 5,5 bei 37°C, A) ohne ASC, B) mit ASC

In Abbildung 50 ist die Konzentration von BM-17-V in Abhängigkeit von der Zeit bei pH 5,5 mit und ohne Zusatz von ASC dargestellt. Der Wirkstoff wurde in die Lösung in einer Konzentration von 10 µg/ml eingearbeitet. Es ist zu erkennen, dass die Konzentration von

BM-17-V in den ersten sechs Stunden unverändert bleibt, danach verringert sich diese etwas. Es bildet sich das Esterprodukt BM-21-V. Innerhalb von insgesamt 30 Stunden nimmt die Wirkstoffmenge von 10 µg/ml auf 9 µg/ml ab, was einer Konzentrationsänderung von 10 % bezogen auf die Ausgangskonzentration entspricht. Wie Abbildung 50 b) zu entnehmen ist, bleibt die Konzentration von BM-17-V unter dem Einfluss von ASC über 30 Stunden unverändert. Die Konzentration des Hydrolyseprodukts erhöht sich geringfügig. Daraus kann man schließen, dass die Hautkonstrukte bei pH 5,5 eine geringe enzymatische Aktivität besitzen, wobei der Abbau des BM-21 Derivats schneller als der BM-17-V Abbau erfolgt. Aus diesem Grund war kein BM-21-V im Medium in Anwesenheit des Konstrukts nachweisbar.

4.8.1.3. Stabilität von BM-17-V bei pH 6,8 und 37 °C bzw. 4 °C

Abbildung 51 zeigt die Metabolisierung des Monoesters BM-17-V in Phosphatpufferlösung pH 6,8 bei 37 °C unter dem Einfluss der organotypischen Hautäquivalente. Der Wirkstoff wurde in die Lösung in einer Konzentration 5 µg/ml eingearbeitet. Die Konzentration von BM-17-V im konstruktfreien und im konstrukthaltigen Medium verringerte sich mit gleicher Geschwindigkeit. Der Abbau ist offensichtlich von Enzymen unabhängig. Es handelt sich folglich um eine nichtenzymatische Umesterung in BM-21-V. Der Abbau erfolgt nach einer Kinetik 2. Ordnung. Im konstrukthaltigen Medium wird BM-21-V sofort weiter zu BM hydrolysiert, während im ASC-freien Medium der weitere Abbau zu BM sehr langsam erfolgt. Abbildung 52 zeigt die Stabilität von BM-17-V bei pH 6,8 und 4 °C. Die Konzentration von BM-17-V bleibt in konstruktfreien und konstrukthaltigen Systemen 30 Stunden lang unverändert. Es ist bemerkenswert, dass BM-17-V bei pH 6,8 und niedriger Temperatur stabil bleibt.

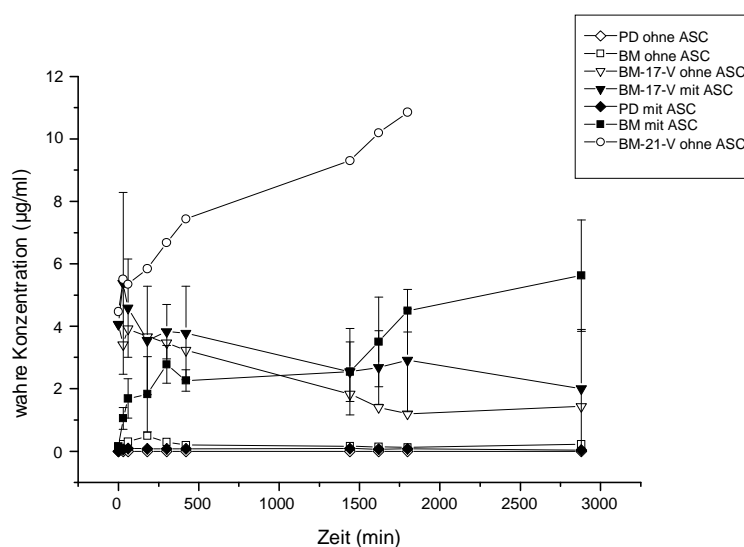


Abbildung 51: Stabilität von BM-17-V in Phosphatpufferlösung pH 6,8 bei 37°C mit und ohne ASC (n=5)

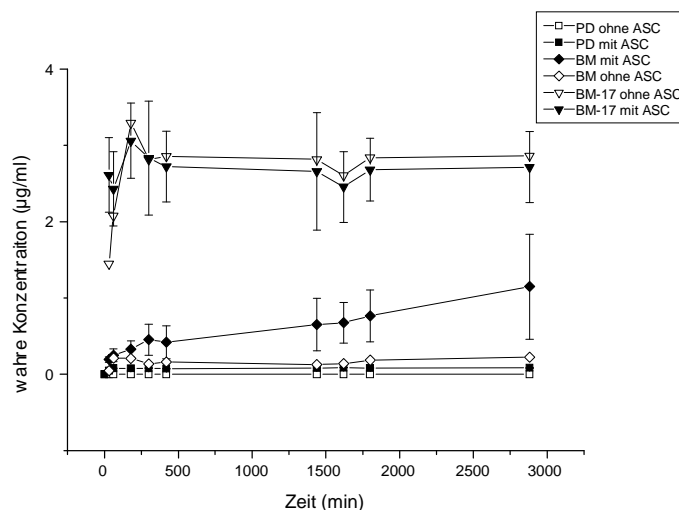


Abbildung 52: Stabilität von BM-17-V in Phosphatpufferlösung pH 6,8 bei 4°C mit und ohne ASC (n=5)

4.8.1.4. Stabilität von BM-17-V bei pH 7,4 und 37 °C

Abbildung 53 zeigt die Metabolisierung des Monoesters BM-17-V in Phosphatpufferlösung pH 7,4 mit und ohne ASC im Vergleich. Der Wirkstoff wurde in die Lösung in einer Konzentration 5 µg/ml eingearbeitet. BM-17-V war instabil. In den ersten 7 Stunden sank die BM-17-V-Konzentration von 3,25 µg/ml auf 1,0 µg/ml. Die Konzentration von BM-17-V verringerte sich im konstruktfreien und konstrukthaltigen System mit ähnlicher Geschwindigkeit wie bei pH 6,8. Der Abbau zu BM-21-V im konstruktfreien System erfolgte nach einer Kinetik pseudo-1.-Ordnung, welche charakteristisch für die Biotransformation der meisten Substanzen ist. Im konstrukthaltigen System wird der zwischenzeitlich gebildete BM-21-V schnell zum freien Alkohol (BM) umgewandelt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Konzentration des gebildeten BM am Ende des Untersuchungszeitraums (30 Stunden) die Konzentration an eingesetztem BM-17-V erreicht. Die Hydrolyse des -21 Derivats in BM verläuft nach der Michaelis-Menten Kinetik. Die BM-Konzentration erreicht nach 23 Stunden 3,0 µg/ml und bleibt während der letzten 6 Stunden konstant.

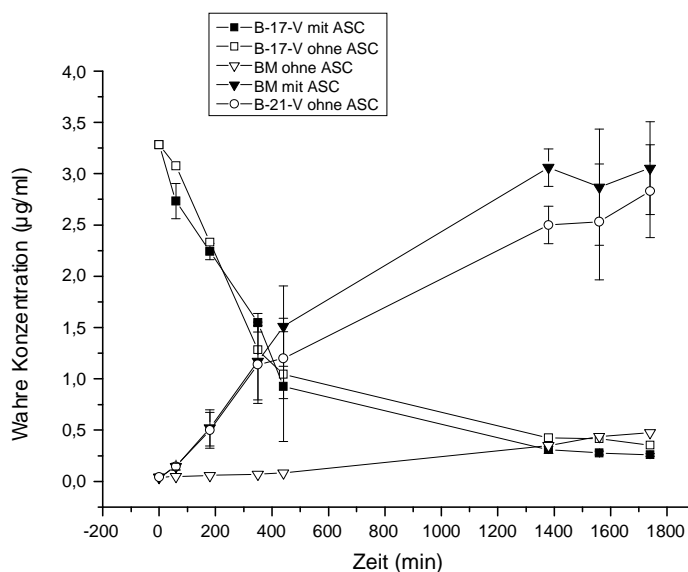


Abbildung 53: Stabilität von BM-17-V in der Phosphatpufferlösung, pH 7,4 bei 37°C mit und ohne ASC (n=5)

An den Ergebnissen der Untersuchungen ist zu erkennen, dass die organotypischen Hautäquivalente (ASC) einen deutlichen Einfluss auf die Biotransformation von BM-17-V haben. In Gegenwart der Hautkonstrukte wird der Wirkstoff über BM-21-V zu seinem Hydrolyseprodukt BM abgebaut. Diese Biotransformation von BM-17-V ist in der Literatur schon beschrieben worden [Bundgaard und Hansen, 1981]. Das Ziel des Experiments war, die enzymatische Aktivität von ASC (TU Braunschweig, Zellkulturlabor) am Beispiel des BM-17-V mit der enzymatischen Aktivität von SC zu vergleichen sowie das pH-Optimum für die Aktivität der ASC zu bestimmen. Da die Biotransformation des BM-17-V nach der Anwendung von Hautkonstrukten die gleiche Biotransformation wie bei den Permeationsuntersuchungen durch SC zeigt, kann man die Konstrukte als Alternative zum SC für die Biotransformationsuntersuchung der enzymatisch instabilen Substanzen einsetzen.

Die logarithmische Darstellung der Konzentrationsänderung wird in Abbildung 54 und Abbildung 55 abgebildet. Die Metabolisierungsgeschwindigkeitskonstanten, die aus den negativen Steigungen der Plots bestimmt werden, sind in Tabelle 33 angegeben. Der Abbauprozess verläuft bei pH 7,4 deutlich schneller, als bei pH 6,8. Die Metabolisierungsgeschwindigkeitskonstante bei pH 7,4 ($K_{7,4}$) ist in Abwesenheit des Konstrukts um 3-fach höher als diejenige bei 6,8 $K_{6,8}$. Die enzymatische Metabolisierungsgeschwindigkeitskonstante in Gegenwart des Konstrukts ist bei pH 7,4 ($EK_{7,4}$) ist um das 6-fache höher als bei pH 6,8 ($EK_{6,8}$) (Tabelle 33).

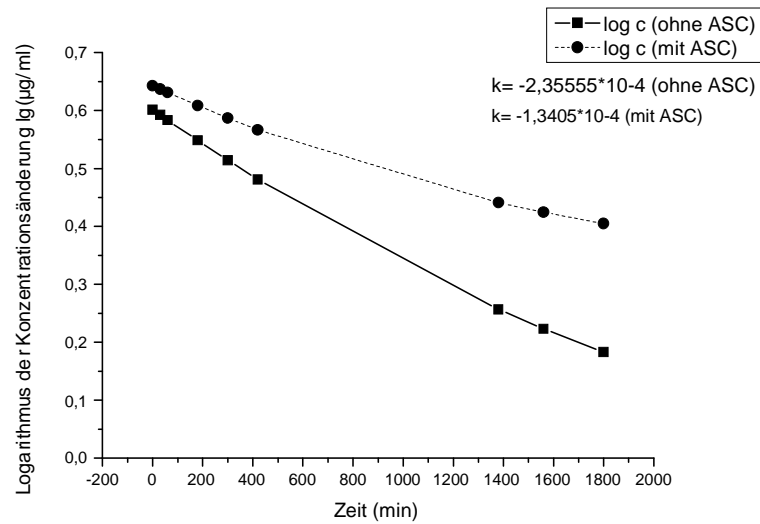


Abbildung 54: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrationsänderung von BM-17-V gegen die Zeit (t), mit und ohne ASC, pH 6,8 bei 37°C

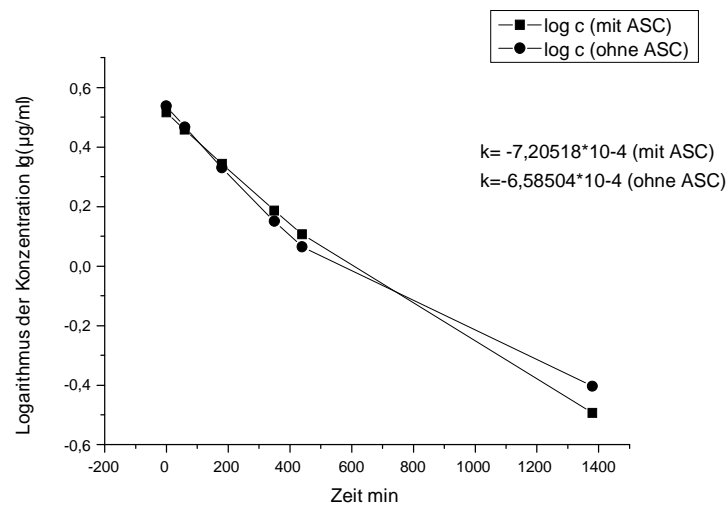


Abbildung 55: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrationsänderung von BM-17-V gegen die Zeit (t), mit und ohne ASC, pH 7,4 bei 37°C

Tabelle 33: Metabolisierungsgeschwindigkeitskonstanten k von BM-17-V bei unterschiedlichen pH Werten, mit und ohne ASC

pH	k
6,8 ohne ASC	$-2,36 \times 10^{-4}$
6,8 mit ASC	$-1,34 \times 10^{-4}$
7,4 ohne ASC	$-6,59 \times 10^{-4}$
7,4 mit ASC	$-7,21 \times 10^{-4}$

4.8.2. Metabolisierung von BM-21-V bei unterschiedlichen pH-Werten mit und ohne ASC

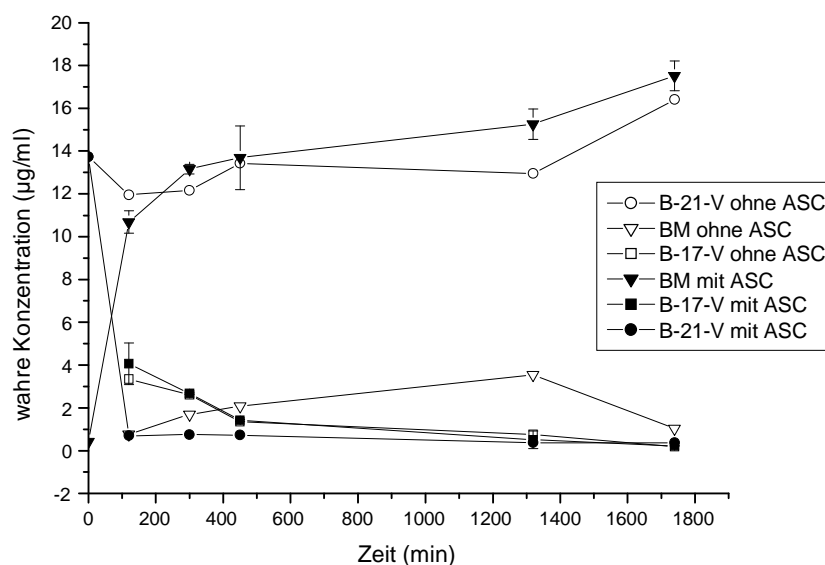


Abbildung 56: Stabilität von BM-21-V in Phosphatpufferlösung bei pH 7,4 und 37°C mit und ohne ASC (n=3)

Die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaues des -21 Derivats ist deutlich schneller als seine Bildung und ist direkt der Enzymkonzentration im Medium proportional. Wie aus Abbildung 56 ersichtlich ist, wird BM-21-V unter dem Einfluss von ASC bei 37 °C rasch in den ersten zwei Stunden zum Hydrolyseprodukt BM abgebaut. Im konstruktfreien System ist BM-21-V stabil, seine Konzentration bleibt über 30 Stunden konstant. Bei 4 °C verläuft der enzymatische Abbau des -21-Derivats bei gleichem pH-Wert von 7,4 deutlich langsamer (Abbildung 57). In den ersten 12 Stunden wird die Konzentration von 1,8 auf 1,4 µg/ml reduziert, was einer Konzentrationsänderung von 30 % bezogen auf die Ausgangskonzentration entspricht. In der letzten Hälfte des Experiments wird der Monoester vollständig abgebaut. Dieser Abbauprozess entspricht einer Kinetik gemischter Ordnung. Im konstruktfreien System bleibt BM-21-V ebenfalls wie bei 37 °C stabil.

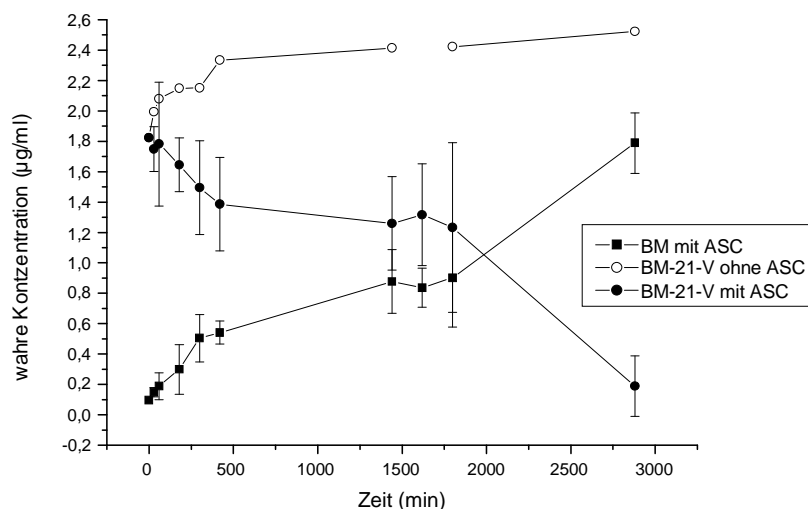


Abbildung 57: Stabilität von BM-21-V in Phosphatpuffer, pH 7,4 bei 4°C mit und ohne ASC (n=3)

4.8.3. Zusammenfassende Diskussion der Metabolisierungsuntersuchungen

Die Untersuchung der Biotransformation von BM-17-V in wässrigen Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten hat gezeigt, dass die Geschwindigkeit der BM-17-V-Metabolisierung vom pH und der Temperatur des Mediums abhängt. Das pH-Optimum für BM-17-V lag im sauren Milieu bei $\text{pH} < 5,0$. Ab $\text{pH} 5,5$ war der Wirkstoff instabil, es erfolgte eine Umesterung des BM-17-V zum thermodynamisch stabilen BM-21-V. Diese Umwandlung der Acyl-Gruppe war eine Folge eines Baseneinflusses, welcher der spontanen Reaktion einer Wasserkatalyse entsprach, und verlief bei BM-17-V nach der Kinetik Pseudo-erster Ordnung. Der enzymatische Abbau von BM-17-V wurde in der Literatur bereits beschrieben [Gysler, 1998; Bundgaard und Hansen, 1981]. Im Rahmen der vorliegenden Studien wurde die enzymatische Aktivität des Hautkonstrukts (TU Braunschweig, Zellkulturlabor) evaluiert. Die Ergebnisse der Biotransformationsuntersuchung haben gezeigt, dass die ASC-Enzyme ab $\text{pH} 5,5$ aktiv waren. BM-17-V wurde unter dem Einfluss von Esterasen über BM-21-V zu BM abgebaut. Bei $\text{pH} 6-8$ unterlag BM-17-V wie alle Steroid-17-Monoester unter Basenkatalyse zunächst einer Umlagerung zum C-21-Monoester, der thermodynamisch stabiler als der C17-Monoester ist [Po et al., 1979]. Dieser Umlagerungsreaktion folgte eine Hydrolyse des C-21-Monoesters zum freien BM. Unter alkalischen Bedingungen, etwa ab $\text{pH} 7-8$, erfolgte die Umlagerungsreaktion wesentlich rascher als die anschließende Hydrolyse. Bei pH-Werten < 7 bildete sich dagegen BM ebenso schnell wie der C-21-Ester entstand. Bundgaard und Hansen (1981) konnten in Phosphatpufferlösungen von $\text{pH} 7,5$ freies BM erst nachweisen, nachdem

sich BM-17-V quantitativ zum C-21-Ester umgelagert hatte. Die enzymatische Metabolisierung bei physiologischem pH 7,4 erfolgte nach der Michaelis-Menten Kinetik.

In der Literatur wurden weitere Zersetzungsprodukte von BM-17-V wie z.B. die C-17-Desoxy-17-carbonsäure sowie C-17-Deoxy-20-hydroxy-21-carbonsäure bereits beschrieben [Sandmann, 1999]. Sie sind jedoch im Laufe der durchgeführten Biotransformationsuntersuchung nicht festgestellt worden.

9- α Prednisolon, das im Laufe des Permeationsexperiments durch das Stratum corneum aus der Basiscreme DAC mit 5 %-igem IPA und IPM Zusatz bestimmt wurde, ist ein Produkt einer chemischen Reaktion, die unter der Zugabe von Alkoholen (IPA) zum Vehikel stattfindet.

4.9. Lagerstabilitätsuntersuchung von BM-17-V in dermalen Zubereitungen

Seit 1990 häufen sich Berichte über Cortikosteroidallergien, deren Ursache auch in Zersetzungsprodukten der Wirkstoffe gesehen wird [Dooms et al., 1986; Freeman, 1995; Pecegueiro, 1995; Rivara et al., 1989]. Dies betont die Bedeutung einer erfolgreichen galenischen Formulierung, die insbesondere die Stabilität des Wirkstoffes in der Grundlage zum Ziel haben sollte. In der Apotheke wird häufig aufgrund ärztlicher Verordnung eine rezepturmäßige Verarbeitung von BM-17-V in Basiscreme DAC vorgenommen. Diese Rezeptur gilt nach Literaturangaben (DAZ, 2004) als Problemrezeptur, aufgrund der schlechten Stabilität des Wirkstoffes in der Creme. BM-17-V wird im sauren, neutralen und basischen Milieu zu einem C-21-Derivat isomerisiert, das nur noch 15 % der Wirksamkeit des 17-valerats besitzt. BM-17-V wird aufgrund seiner geringeren Anfälligkeit gegenüber Oxidationsreaktionen bei Wahl eines geeigneten pH-Wertes der Wasserphase durch Temperaturerhöhung oder oxidationsfördernde Maßnahmen weniger in seiner Stabilität beeinflusst als andere Glukokortikoide, wie z.B. Hydrokortison. Durch Kombination eines Komplexbildners, eines Redoxstabilisators sowie eines Antioxidans mit einem pH von 4,5 in der Wasserphase gelang es jedoch, die Voraussetzungen zur Herstellung einer stabilen Creme zu schaffen [DAZ, 2004].

Der Abbau von Cortikosteroiden in halbfesten Zweiphasensystemen führt nicht zu einem definierten Zersetzungsprodukt, sondern umfasst in der Regel eine Vielzahl von Parallel- und Folgereaktionen mit entsprechend zahlreichen Zwischen- und Endprodukten. Die Temperaturabhängigkeit der Zersetzungsgeschwindigkeit BM-17-V in O/W Cremes lässt sich daher nicht durch die für zahlreiche homogene Systeme gültige Arrheniusbeziehung beschreiben. Für diese Tatsache können folgende Ursachen verantwortlich sein:

- Der Abbau der C-17-Seitenkette von Corticosteroiden besteht aus einer Reihe von Reaktionsschritten und ist von mehreren Einflussfaktoren abhängig. Der

Ausgangsstoff kann in Parallel- und Folgereaktionen oxidativer Zersetzung, nichtoxidativer Dehydratation oder hydrolytischer Spaltung unterliegen. Auch Umlagerungsreaktionen treten auf. Solche komplexen Reaktionen können im Allgemeinen nicht durch Gleichungen 0., 1., 2., oder 3. Ordnung beschrieben werden [Perlia, 1967].

- Für Steroide sind Kristallmodifikationen unterschiedlicher thermodynamischer Aktivität bekannt. Aufgrund einer beschleunigten Umwandlung polymorpher Kristalle bei erhöhter Lagertemperatur können wiederum Löslichkeitsunterschiede auftreten, welche ein Partikelwachstum in Abhängigkeit von Lagertemperatur und Lagerzeit zur Folge haben.

Bei der Entwicklung einer kortikosteroidhaltigen O/W-Creme kommen dem pH-Wert der Wasserphase und der Zusammensetzung der Formulierung besondere Bedeutung zu. Da Oxidationsreaktionen beim Abbau der Steroide eine wesentliche Rolle spielen und diese in der Regel basenkatalysiert sind, sollte der pH-Wert keinesfalls im Alkalischen liegen. Das relative pH-Optimum sollte im schwach sauren Bereich liegen (4,5 - 5,0), in dem O/W-Emulsionen gut hautverträglich sind. Bezüglich der Zusammensetzung der Rezeptur können z.B. Glycerin oder Propylenglycol- Zusätze zur Wasserphase die Dielektrizitätskonstante herabsetzen und damit einen positiven Einfluss auf die Steroidstabilität zeigen.

In diesem Kapitel wird die Stabilität der Rezeptur 0,1 % BM-17-V in der Basiscreme DAC im Bezug auf unterschiedliche Lagertemperaturbedingungen untersucht. Außerdem wird untersucht, ob die Einarbeitung von drei Kortikoiden (BM, BM-17-V und Prednisolon) in einer Rezeptur sich gegenseitig beeinflusst und ob die Reduzierung des Wasseranteils in der Stammrezeptur – Basiscreme DAC die Umesterung von BM-17-V vermeiden kann.

4.9.1. Stabilität von BM-17-V in der Basiscreme DAC

Abbildung 58 und Abbildung 59 präsentieren die Stabilitätsuntersuchung von BM-17-V in Basiscreme DAC bei RT und bei +4°C während eines Untersuchungszeitraums von 40 Tagen. Wie ersichtlich ist, werden 2 % des Wirkstoffes nach einer Woche, nach 2 Wochen werden insgesamt 5 % des Wirkstoffes zu BM-21 Derivat abgebaut. Nach 40 Tagen reduziert sich die Menge an BM-17-V in der Zubereitung auf bis zu 81 %. Bei + 4 °C ist der Wirkstoff in den Formulierungen stabil, nach 40 Tagen bleibt der Wirkstoffgehalt in der Formulierung bei 99 %, was den zulässigen Gehaltsabweichungen der Ph.Eur.IV entspricht.

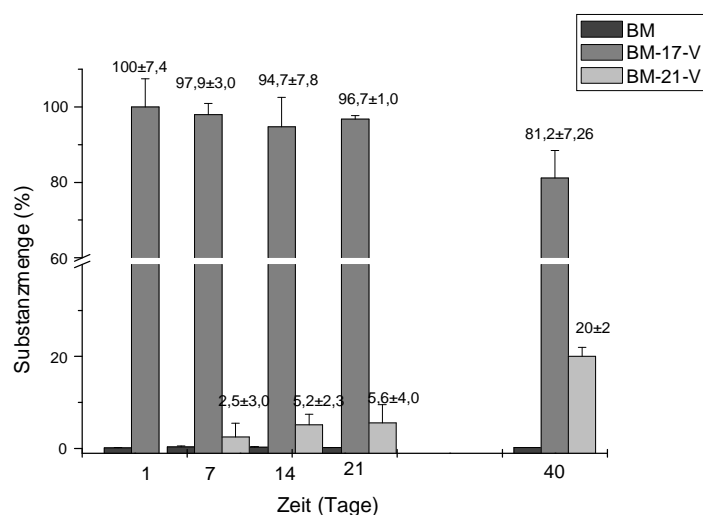


Abbildung 58: Lagerstabilität von Betamethason-17-valerat in Basiscreme DAC bei RT (n=4-7)

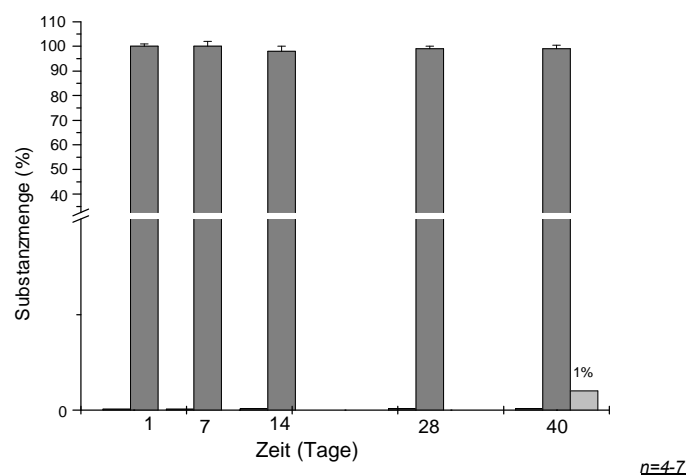


Abbildung 59: Lagerstabilität von Betamethason-17-valerat in Basiscreme DAC bei 4°C (n=4-7)

4.9.2. Stabilität von BM-17-V, BM, Prednisolon in Basiscreme DAC

In der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4.4.2.) wurde die Permeation von BM-17-V aus der Basiscreme bereits beschrieben. Es wurde festgestellt, dass BM-17-V nicht nur zum Hydrolyseprodukt BM abgebaut wird, sondern das entstehende BM weiter zu Prednisolon abgebaut wird. Darüber hinaus war es interessant eine mögliche Wechselwirkung zwischen diesen Kortikoiden nachzuweisen und zu untersuchen, ob diese Wechselwirkungen einen positiven oder negativen Einfluss auf die Stabilität von BM-17-V haben. Die Abbildung 60 und Abbildung 61 zeigen die Stabilität der Kortikoide BM, B-17-V und PD in der Grundlage Basiscreme DAC bei RT und bei 4 °C Lagerung über 40 Tage. Alle Substanzen wurden in einer

Konzentration von 0,1% (w/w) zusammen in die Basiscreme eingearbeitet. Obwohl BM-21-V bei RT nach einer Woche in der Formulierung nicht detektierbar ist, ist in der Zubereitung die Umesterung von BM-17-V in BM-21-V nicht auszuschließen, weil sich der BM-17-V Gehalt verringert. Insgesamt reduziert sich die Menge an BM-17-V nach 40 Tagen Lagerung auf 87 %. Eine gegenseitige Wechselwirkung zwischen den drei Glukokortikoiden konnte nicht festgestellt werden. Der Gehalt an PD und BM bleibt nach 40 Tagen unverändert bei 100 %. Bei der Lagerung bei +4 °C sind alle drei Kortikoide ebenfalls über die gesamte Versuchsdauer stabil.

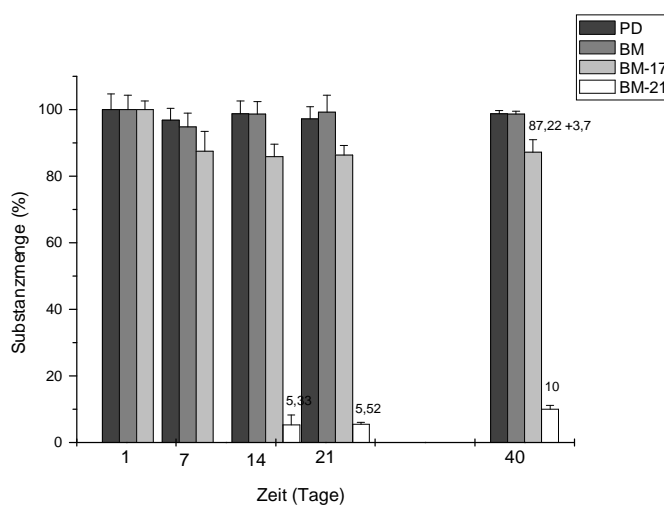


Abbildung 60: Lagerstabilität von Betamethason-17-valerat, Betamethason und Prednisolon in Basiscreme DAC bei RT (n=4-7)

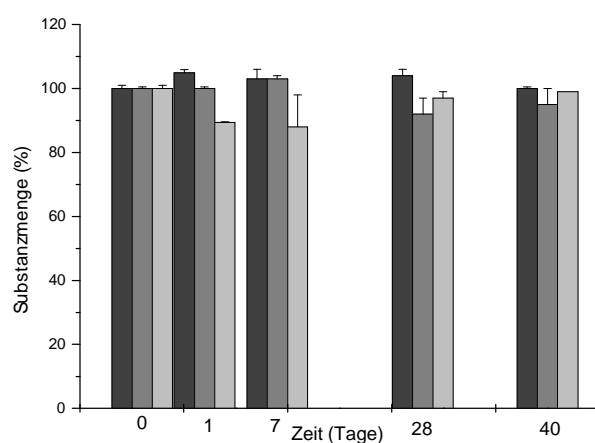


Abbildung 61: Lagerstabilität von Betamethason-17-valerat, Betamethason und Prednisolon in Basiscreme DAC bei 4 °C (n=4-7)

4.9.3. Stabilität von BM-17-V in der Basiscreme DAC mit geringerem Wasseranteil

Eine weitere Stabilitätsuntersuchung zeigt den Einfluss eines reduzierten Wasseranteils in der Rezeptur Basiscreme auf die Stabilität von BM-17-V. Ein erhöhter Wassergehalt gilt als Voraussetzung für einen beschleunigten Wirkstoffabbau [Neumayer, 1999]. Die Metabolisierung von BM-17-V erfolgt in der wässrigen Phase. Um den Wassereffekt zu minimieren und damit die Metabolisierung des Wirkstoffs herabzusetzen, wurde eine Abwandlung der Basiscreme hergestellt, in welcher statt 40 % nur 20 % Wasser eingearbeitet wurde. Mit einem reduzierten Wasseranteil (20 %) verläuft der Metabolisierungsprozess etwas langsamer (Abbildung 62) als in der Ausgangsrezeptur (0,1% BM-17-V in Basiscreme DAC) (Abbildung 58). In Basiscreme DAC mit reduziertem Wasseranteil wird nach einer Woche Lagerung 1 % des Wirkstoffes zu BM-21-V abgebaut, nach 40 Tagen reduziert sich der Gehalt an BM-17-V in der Grundlage auf 87 %. Bei +4°C ist der Wirkstoff in der Grundlage ebenfalls wie in der Originalrezeptur über die ganze Untersuchungszeit von 40 Tagen stabil (Abbildung 63).

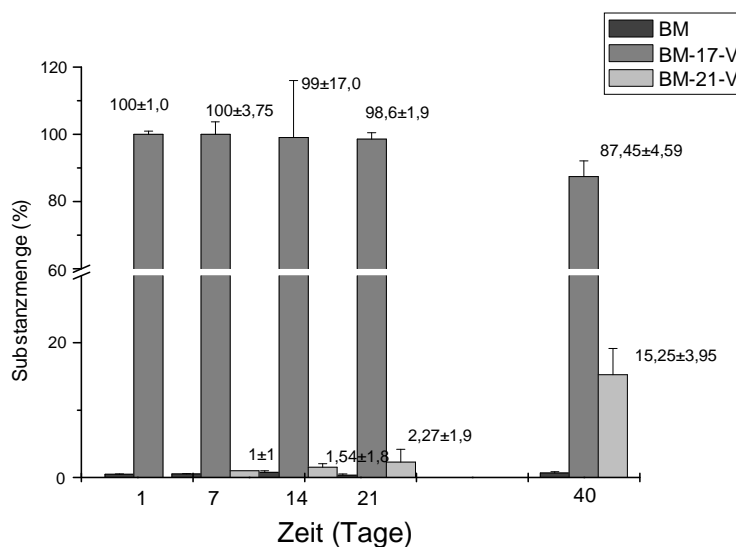


Abbildung 62: Lagerstabilität von Betamethason-17-valerat in Basiscreme DAC mit reduziertem Wasseranteil bei RT (n=4-7)

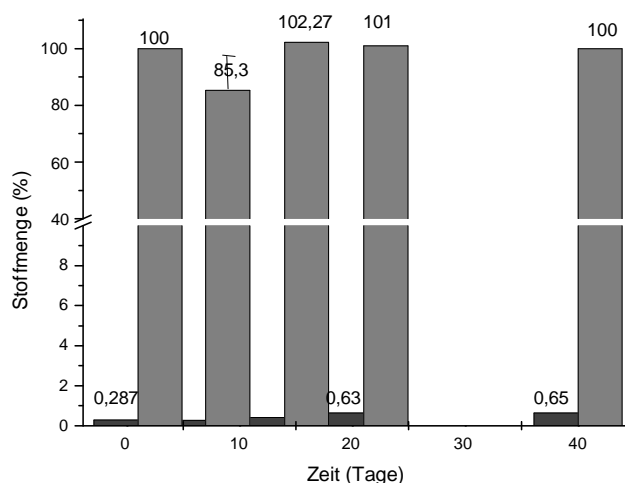


Abbildung 63: Lagerstabilität von Betamethason-17-valerat in Basiscreme DAC mit reduziertem Wasseranteil bei 4°C (n=4-7)

4.9.4. Zusammenfassung der Stabilitätsuntersuchungen

Da BM-17-V aufgrund ärztlicher Verordnung häufig in der Apotheke verarbeitet und in Basiscreme DAC eingearbeitet wird, sollte die Stabilität von BM-17-V in dieser Formulierung bestimmt werden, weil diese wegen einer schnellen Wirkstoffzersetzung als Problemrezeptur eingeordnet wird. Die Stabilität des Wirkstoffes wurde bei zwei unterschiedlichen Lagerbedingungen, bei RT und 4 °C, untersucht. Weiterhin wurden der Effekt einer Reduzierung des Wasseranteils in der Formulierung, eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Abbauprodukten von BM-17-V, sowie Betamethason und Prednisolon in Bezug auf deren Stabilität untersucht.

Im Laufe der Untersuchung wurde folgendes festgestellt:

Die Stabilität von BM-17-V in der Grundlage Basiscreme DAC ist aufgrund des pH-Wertes von 6,8 (schwach sauer/ neutral) und des relativ hohen Wasseranteils (40 % m/m) ungenügend. Der Wirkstoff wird zum schwach wirksamen Derivat BM-21-V umgebaut. Die Reduzierung des Wasseranteils in der Grundlage auf die Hälfte verzögert die Zersetzung des BM-17-V, verhindert diese jedoch nicht. Bei Einarbeitung von PD, BM und BM-17-V traten keine Wechselwirkungen auf, die die Wirkstoffstabilität erhöhen könnten. BM-17-V wurde ebenfalls in das 21- Derivat abgebaut.

Die Untersuchung aller drei Formulierungen bei 4 °C zeigte, dass die niedrigere Temperatur die Stabilität des Wirkstoffes in der Grundlage erhöht. Der Wirkstoffgehalt blieb 40 Tage lang unverändert. Daraus könnte man schließen, dass die Hydrolyse des 21-Esters in O/W-

Cremes bei pH-Werten $> 6,8$ direkt auf die Umlagerungsreaktion zu folgen scheint. Niedrigere Lagertemperaturen wie z.B. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ können den schnellen Abbau jedoch verhindern. Die Ergebnisse der durchgeführten Studie zeigen, dass die Lagerung der Zubereitungen bei 4°C den Zersetzungsprozess einschränken. Darüber hinaus sollte die Verpackung mit dem Hinweis „kühl lagern!“ versehen werden.

5. Abschlussdiskussion

5.1. Freisetzungsuntersuchungen

Für den therapeutischen Effekt von Glukokortikoiden in der Haut ist es nötig, dass eine ausreichende Menge des Arzneistoffs aus der Grundlage freigesetzt wird und möglichst vollständig in das Stratum corneum penetriert. Neben Permeationsuntersuchungen durch humane Hornhaut ist es wichtig, das Liberationsverhalten der Formulierungen zu untersuchen, um zu bestimmen in welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit der Wirkstoff für die Penetration in die Haut zur Verfügung steht. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden die Fertigarzneimittel Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe sowie mehrere DAB-Grundlagen untersucht. Die Freisetzung von BM-17-V aus diesen Formulierungen verlief nach unterschiedlichen Kinetiken. Soderm® Salbe und Celestan-V® Creme zeigten ein besseres Freisetzungsverhalten als Celestan-V® Salbe, die Liberation erfolgte nach einer Kinetik Pseudo-0.Ordnung. Die Freisetzung aus Celestan-V® Salbe verlief nach der Quadratwurzel-Kinetik. Die DAB-Formulierungen zeigten signifikante Unterschiede im Freisetzungsverhalten. Bei wasserhaltigen Emulsionssalben spielte es eine große Rolle, ob das Wasser die innere oder die äußere Phase bildete. Während die Höhe des Wassergehaltes bei W/O-Emulsionen einen relativ geringen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit hatte, hing sie bei O/W-Emulsionen in erheblichem Maße davon ab. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früher beschriebenen Ergebnissen über das Freisetzungsverhalten aus halbfesten Zubereitungen [Loth, 1981]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Erhöhung des Wasseranteils auf bis zu 70 % (m/m) wie in der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe das verbesserte Liberationsverhalten im Vergleich zur Nichtionischen Hydrophilen Creme (50 % Wasser) bewirkte. Durch die Erhöhung des Wasseranteils in der Formulierung verbesserte sich die Löslichkeit des Arzneistoffes in der Formulierung. Die Diffusion aus dem Gelgerüst heraus konnte so schneller ablaufen, was den Unterschied zu den lipophileren Formulierungen wie Hydrophile Salbe (HS), Wollwachsalkoholsalbe (WS) sowie den Unterschied zu amphiphiler Basiscreme DAC erklären könnte. Bei der Freisetzung aus allen DAB-Formulierungen lag eine Mischkinetik vor.

Werden Formulierungen mit Enhancern angereichert, verursacht bereits das Vehikel einen starken Effekt auf die Arzneistofffreigabe. Alberg (1998) hat am Beispiel von Soventol® Creme gezeigt, dass eine reduzierte Wirkstoffmenge in der Formulierung mit Enhancer zu keiner Permeationsreduzierung führte, sondern eine wesentlich höhere Liberation im Vergleich zu den Formulierungen ohne Enhancer mit der ursprünglichen Konzentration zur Folge hatte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkstofffreisetzung aus dem Vehikel von der Zusammensetzung, dem Wasseranteil und der Viskosität der Zubereitung abhängig ist. Trotzdem ist bei kortikoidhaltigen Präparaten nicht immer ein Zusammenhang zwischen dem Freisetzungs- und Permeationsverhalten zu finden. Das beste Liberationsvermögen kann die schlechteste Permeation zur Folge haben, wenn der Wirkstoff vollständig im SC gespeichert wird. Aus diesen Gründen konzentrierten sich weitere Experimente von halbfesten Formulierungen auf Permeationsversuche mit humanem SC, um die für den gewünschten therapeutischen Effekt verfügbare Arzneistoffmenge in der Haut abschätzen zu können.

5.2. Permeationsverhalten von BM-17-V aus Cremes und Salben, sowie aus ihren Verdünnungen durch exzidiertes Stratum corneum

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Permeationsuntersuchungen durch exzidiertes humanes Stratum corneum von BM-17-V aus verschiedenen Arzneibuchgrundlagen durchgeführt und mit den Fertigarzneimitteln Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme und Celestan-V® Salbe verglichen. Bei allen verwendeten Grundlagen wurden Permeationsdaten für Betamethason ermittelt, das im Laufe der Permeationsuntersuchung in Folge von Hydrolyse gebildet wurde. Bei den Permeationsuntersuchungen wurde festgestellt, dass die Fertigarzneimittel hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens identisch waren. Das gleiche Ergebnis war bereits für ein anderes Glukokortikoid, Hydrocortison (HC), beobachtet worden. In Arbeiten von Alberg (1998), Refai und Müller-Goymann (1999; 2002) und Brinkmann (2006) erwiesen sich verschiedene HC-Fertigarzneimittel, außer Soventol® Creme, hinsichtlich des Permeationsverhaltens von HC als gleichwertig.

Bei der Permeation von BM-17-V aus DAB-Grundlagen ergaben sich Unterschiede. Wollwachsalkoholsalbe sowie Wasserhaltige Hydrophile Salbe und die Basiscreme DAC besaßen eine gute BM-17-V Permeabilität, während aus Nichtionischer Hydrophiler Creme und Hydrophiler Salbe eine schlechte Permeation des Arzneistoffs resultierte. Im Vergleich zu den Fertigarzneimitteln hatte WS ähnlich gute Permeationseigenschaften wie Soderm® Salbe und Celestan-V® Salbe. Die gute Permeabilität von WS ist durch den Okklusionseffekt der enthaltenen Vaseline zu erklären, durch welchen die Hauthydratation gesteigert wird. Pellanda et al. (2007) haben festgestellt, dass die Okklusion eine Erhöhung des topisch applizierten Triamcinolon in der Haut zur Folge hat. Die Applikation einer wasserfreien Salbe auf die Haut reduziert die Wasserverdunstung aus der Haut und bewirkt so eine Erhöhung der Hauthydratation. Dadurch nimmt für die meisten Wirkstoffe die Permeabilität zu. Die Applikation einer Creme oder Lotion führt hingegen zu keiner vollständigen

Abdeckung der Haut. Es kommt zu keiner Zunahme des Wassergehalts im SC, weil ein ständiger Gas- und Wasser- Austausch zwischen Haut und Atmosphäre erfolgt. Die oben beschriebenen Phänomene gelten natürlich nur für unverletzte Haut. Im Fall ihrer Schädigung kann es zu ganz anderen Ergebnissen führen. Die bessere Arzneistoff-Permeabilität aus der Basiscreme im Vergleich zur WS ist mit dem Propylenglykolsatz als Penetrationsförderer sowie mit einer Erhöhung der BM-17-V-Löslichkeit im Vehikel zu erklären. In Einklang mit dem besten Freisetzungsvermögen für BM-17-V zeigte WHS ebenfalls eine gute Permeation.

Die Wirkstoffpermeation durch SC aus halbfesten Zubereitungen ist von der Intaktheit der Struktur des Stratum corneum und von dessen Sättigung mit dem Arzneistoff abhängig. In Abhängigkeit vom Typ der eingesetzten Formulierung, ob Suspensions- oder Lösungssystem, sowie von ihrem Einfluss auf die SC-Mikrostruktur, resultieren Unterschiede im Permeationsverhalten.

In der Arbeit wurde außerdem der Verdünnungseffekt von halbfesten BM-17-V-Formulierungen auf deren Permeation untersucht. Die lipophile Grundlage WS wurde im Verhältnis (1:1) mit allen Arzneibuchgrundlagen verdünnt. Je nach Affinität des Wirkstoffes zu der jeweiligen Verdünnungsgrundlage, variierte die resultierende Sättigungskonzentration des Arzneistoffes von 0,0005 % bis 0,02 %. Die Zunahme der Sättigungskonzentration im Zuge der Verdünnung mit Grundlagen des O/W-Typs, zeigte keinen Einfluss auf die Permeationsgeschwindigkeit des Arzneistoffes aus der jeweiligen Formulierung. Die Reduzierung der Wirkstoffkonzentration auf die Hälfte sowie der Austausch eines Teils der Grundlage WS gegen eine wasserfreie bzw. wasserhaltige Grundlage führte zu keiner Reduzierung der Arzneistoffpermeation, weil die erhaltene Wirkstoffkonzentration in der Zubereitung höher als ihre Sättigungskonzentration war. Den gleichen Effekt für verdünnte HC-Zubereitungen hat Refai und Müller-Goymann (1999; 2002), für Prednicarbat- Zubereitungen Brinkmann (2006) beobachtet. Trotz der verbesserten Löslichkeit, blieb die BM-17-V Sättigungskonzentration in den Grundlagen niedriger als die eingearbeitete Konzentration. Die geringeren Werte des elastischen und viskosen Moduls, wie z.B. bei der Verdünnung der Wollwachsalkoholsalbe mit der Basiscreme DAC, haben jedoch einen leichten Anstieg der Wirkstoffpermeation trotz geringerer Wirkstoffkonzentration im Vergleich zur Originalrezeptur verursacht.

5.3. Einfluss verschiedener Hilfsstoffe auf die Permeation von BM-17-V durch Stratum corneum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, eine Erhöhung der dermalen Verfügbarkeit von BM-17-V durch eine Modifizierung der Grundlage zu erreichen. Es wurde der Effekt einiger Hilfsstoffe, wie Isopropylmyristat und Isopropylalkohol, kombiniert mit unterschiedlichen halbfesten Zubereitungen, auf das Permeationsverhalten von BM-17-V untersucht. Neubert und Pötzsch (2004) haben aus Soventol® Creme die größere topische Verfügbarkeit von HC-acetat festgestellt. Alberg (1998), Refai (2001) und Brinkmann (2006) haben das Fertigarzneimittel - Soventol® Creme hinsichtlich des Permeationsverhaltens von HC als beste Zubereitung vorgeschlagen. Die Soventol® Creme wurde auch im Rahmen der vorliegenden Studie als Grundlage mit der höchsten Permeabilität für BM-17-V eingestuft. Die herausragende penetrationsfördernde Eigenschaft der Soventol® Creme wurde auf Isopropylalkohol (IPA) und Isopropylmyristat (IPM) und auf ihren Einfluss auf die Veränderung der SC-Lipidstruktur zurückgeführt. IPA und IPM als alleinige Zusätze zeigten sehr unterschiedliche Effekte auf die Permeation. Die Zugabe von IPA in einer Konzentration von 5 % (m/m) zur Grundlage WS erhöhte die Permeation für BM im Vergleich zur Arzneistoffpermeation aus der IPA-freien Grundlage um das 2-fache. Den Anstieg der Permeation konnte man mit einer verbesserten Löslichkeit des Wirkstoffes in der Grundlage erklären (Erhöhung der Sättigungskonzentration um Faktor 37). Der andere Grund für die erhöhten Permeationsraten war, wie DSC-Untersuchungen zeigten, die Veränderung der Mikrostruktur des SC durch diese Grundlage.

Die Zugabe von IPM reduzierte die Permeation von BM um das 4-fache. Das Ergebnis ließ sich durch die Verschlechterung der Wirkstofflöslichkeit im Vehikel und durch die Veränderung der SC-Mikrostruktur in Richtung einer Stärkung der SC-Barriere erklären. Die Kombination IPA und IPM im gleichen Verhältnis zeigte einen synergistischen Effekt und resultierte in einer Zunahme der Wirkstoffpermeation um das 3-fache im Vergleich zur Arzneistoffpermeation aus der reinen Grundlage. Die Verbesserung der Permeation ist durch die erhöhte Löslichkeit um das 18-fache und durch eine Veränderung der Lipidorganisation, zu erklären. Beide Hilfsstoffe penetrierten ins SC und führten wahrscheinlich durch eine Fluidisierung der Lipide zur Desorganisation der hohen Ordnung der Lipidpackung.

Die Kombination von IPA und IPM im Verhältnis 1:1 führte auch im O/W-System Basiscreme DAC zu einer Verbesserung der Permeabilität für BM um das 2-fache im Vergleich zur Arzneistoffpermeation aus der IPA/IPM-freien Grundlage. Die höhere Permeabilität aus der Rezeptur mit IPA/IPM-Zusatz ließ sich durch die Verbesserung der Löslichkeit des Wirkstoffes in der Grundlage und den Enhancereffekt auf die SC-Struktur erklären. Die

Ergebnisse dieser Studie korrelieren mit früher beschriebenen Ergebnissen über den synergistischen Effekt einer kombinierten IPA und IPM- Anreicherung, der am Beispiel von Soventol® Creme entdeckt wurde [Alberg, 1998; Refai und Müller-Goymann, 1999] und weiter am Beispiel der WHS für HC [Brinkmann und Müller-Goymann, 2003] bestätigt wurde.

Ergänzend wurde als weitere IPA-haltige Zubereitung das in der Arbeitsgruppe entwickelte Thermogel untersucht [Grüning und Müller-Goymann, 2006]. Diese Formulierung wies eine schlechtere Permeationsaktivität für BM im Vergleich zur Soventol® Creme auf. Dieser Befund stützt die Erkenntnis, dass die Kombination IPA/IPM besser als IPA alleine wirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Kombination von Ethanol und Nerzöl (Triglycerid ungesättigter Fettsäuren) untersucht. Die penetrationsfördernden Eigenschaften von Ethanol wurden in der Literatur bereits beschrieben [Brand et al., 2006]. Allerdings haben Alberg und Müller-Goymann (1999) am Beispiel von WHS für HC-acetat festgestellt, dass eine Ethanolzugabe nicht unbedingt zur Permeationserhöhung führt. Die penetrationsfördernden Eigenschaften von Triglyceriden sind auch bekannt. Loth (1989) hat z.B. einen penetrationsfördernden Effekt für das Triglycerid Softisan festgestellt. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine Nerzöl-Emulsion – Müstella Creme untersucht. Für HC zeigte die Formulierung die gleiche Permeabilität wie das FAM Hydroderm® HC Creme, Dermatop®-Basiscreme und Dermallerg-ratiopharm® Creme. Im Hinblick auf BM-17-V war Müstella Creme mit der Basiscreme identisch, hatte aber ein deutlich niedrigeres Permeationsverhalten als Soventol® Creme. Das bedeutet, dass die Triglyceride nicht immer eine Permeationszunahme zur Folge haben. Es wurde eine neue Rezeptur (Variation IV) auf der Basis Müstella Creme mit der Kombination von Nerzöl/Ethanol hergestellt und hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens untersucht. Im Vergleich zum Originalprodukt zeigte diese Zubereitung eine wesentlich höhere Permeabilität. Die bessere Permeabilität ist unter Berücksichtigung von Literaturdaten auf einen synergistischen Effekt der Enhancerkombination zurückzuführen. Panchagnula et al. (2005) haben einen penetrationsfördernden Effekt für die binäre Kombination von Ethanol/IPM (1:1), Pillai et al. (2004) für die Kombination von Fettsäuren/ Ethanol festgestellt.

Die Variation IV zeigte eine bessere Permeationsaktivität für BM als die DAC- und DAB-Grundlagen. Wenn man den Flux J der Variation IV mit den FAM vergleicht, ergibt sich folgende Rangfolge:

Variation IV > Basiscreme DAC > Soderm Salbe® = Wollwachsalkoholsalbe = Celestan-V® Creme = Celestan-V® Salbe.

Vergleicht man den Flux J von Variation IV mit den Formulierungen mit IPA/IPM ergibt sich folgende Rangfolge:

Soventol® Creme > Wollwachsalkoholsalbe mit IPA/IPM > Thermogel > Variation IV (ohne bzw. mit IPA/IPM) > Basiscreme DAC mit IPA/IPM

Da die Variation IV gute Eigenschaften für die menschliche Haut (keine Enhancer, Nerzöl enthält eine natürliche Fettsäurenkombination, gute Streichfähigkeit) besitzt, könnte sie als Cremegrundlage für BM-17-V vorgeschlagen werden.

Es wurde versucht, die dermale Verfügbarkeit von BM-17-V durch die Modifizierung der Variation IV zu steigern.

Die Zugabe einer Kombination von Propylenglykol und DMSO zur Grundlage verschlechterte jedoch die Permeation für BM im Vergleich zur Arzneistoffpermeation aus der reinen Zubereitung, IPA/IPM in Kombination übten ebenfalls keinen Einfluss aus. Diese Ergebnisse waren insofern überraschend, als frühere Permeationsergebnisse einen potenzierenden Effekt der Kombination in WS und in Basiscreme DAC gezeigt hatten. Wahrscheinlich liegt es daran, dass die Zubereitung bereits eine Kombination von Ethanol/Triglyceriden enthält, die einen maximalen Effekt auf die SC-Struktur ausüben, so dass ein zusätzlicher Effekt der IPA/IPM-Kombination nicht mehr zum Tragen kommt.

5.4. Effekt unterschiedlicher Hilfsstoffe auf die Mikrostruktur der Hornschicht

Durch den Zusatz von Hilfsstoffen kann die Penetration für Wirkstoffe wesentlich gesteigert, aber auch reduziert werden. Grund dafür sind strukturelle Veränderungen der Hautlipide und Korneozyten, welche zur Lockerung oder im Gegenteil zur Verdichtung der Hornschicht führen können. Für die Detektion einer Wechselwirkung zwischen Vehikel und Stratum corneum werden thermo- und röntgenanalytische Methoden angewendet: Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC), Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) und Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen halbfesten Zubereitungen des DAB, DAC und von Fertigarzneimitteln auf die Stratum corneum Struktur untersucht. Weiterhin wurde der Effekt von Isopropylalkohol, Isopropylmyristat und Nerzöl als Einzelsubstanz und in Kombination nach Einarbeitung in unterschiedliche Zubereitungen auf die SC-Mikrostruktur untersucht.

Bei mit WS und Basiscreme behandeltem SC machten DSC-Ergebnisse Wechselwirkungen mit den Hornschichtbestandteilen nur nach Anwendung von Basiscreme deutlich. WS führte im Vergleich hierzu zu keiner eindeutigen Veränderung. Das in der Basiscreme DAC enthaltene

Propylenglycol, das als Penetrationenhancer einzustufen ist, könnte die Mikrostruktur der Hornschicht beeinflusst haben.

Um auszuschließen, dass der Wirkstoff – BM-17-V selbst den Effekt auf das SC hat, wurden DSC-Untersuchungen mit BM-17-V-haltigen Formulierungen, die selbst im Bezug auf SC inert sind, durchgeführt. DSC-Untersuchungen an mit Soderm® Salbe behandeltem SC haben gezeigt, dass der Wirkstoff keine Wechselwirkungen mit den Lipiden und Proteinen innerhalb des SC eingeht.

Der Ester Isopropylmyristat (IPM) in Kombination mit Wollwachsalkoholsalbe (WS) reduzierte die BM-17-V-Permeation. Dieses Phänomen der verschlechterten Permeabilität bei Zugabe von IPM wurde in der Literatur für das Kortikosteroid Hydrokortison bereits beschrieben [Brinkmann und Müller-Goymann, 2003]. Die Behandlung des SC mit IPM hat eine Disposition der Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen zur Folge. Diese Verschiebung war nicht in Sinne einer Fluidisierung der SC-Lipide zu interpretieren, wie von einigen Autoren bereits beschrieben wurde [Barry 1987a,b; Golden et al., 1987]. Golden et al. (1987) postulierten, dass sich IPM, dank ähnlicher Lipophilie zur Ölsäure, in die Lipidlamellen einlagern und so eine dichte Packung der Lipidlamellen stören könnte. Andere Autoren haben vermutet, dass IPM im SC als separate Phase vorliegen könnte [Francouer et al., 1990; Walker und Hadgraft, 1991]. Rowat et al., (2006) berichteten, dass Ölsäure eine Fraktion der endogenen Komponenten aus dem SC extrahieren könnte, auf diese Weise die kristalline Fraktion der Lipide vermindert und mehr permeable Wege innerhalb der Lipiddomänen schafft. Leopold und Lippold (1995a) sowie Smith und Maibach (2005) beschrieben eine Verfestigung des SC durch die Penetration von IPM-Molekülen in die SC-Lipiddoppelschicht und durch den Einbau zwischen die Kohlenwasserstoffreste des SC. Nach der Behandlung des SC mit IPM würde offensichtlich eine Zunahme der orthorhombisch geordneten Lipide parallel mit einer folgenden Abnahme der hexagonalen Lipidpackung erfolgen. Aus diesen Ergebnissen leiteten Brinkmann und Müller-Goymann (2005) eine Integrierung der IPM- Moleküle in die Lipidkette ab, was eine Verfestigung der Lipide zur Folge haben müsste. Diese in der Literatur beschriebenen Hypothesen stehen in Übereinstimmung mit den Interpretationen der durchgeführten Studie über die dichtgepackte Lipidorganisationsstruktur und eine auf diese Weise verstärkte Barriereeigenschaft des SC.

Die kalorimetrischen Daten konnten zeigen, dass die Applikation von reinem IPA sowie in einer Kombination mit WS die Hautlipide beeinflusst. Diese neuen Ergebnisse wichen von früher beschriebenen Daten ab [Brinkmann und Müller-Goymann, 2003; Refai 2001]. Der offensichtliche Effekt des IPA in der vorliegenden Arbeit, stimmte mit neuesten Interpretationen einer Alkoholeffekt-Studie [Williams und Barry, 2004] überein. Es wurde

postuliert, dass Alkohole, wie z.B. IPA, einige Lipide und Proteine aus dem SC extrahieren können und damit die Porosität des SC erhöhen.

In Kombination zeigten die beiden Hilfsstoffe IPA und IPM einen potenzierenden Effekt hinsichtlich des BM-Permeationsverhaltens. Wie DSC-Daten zu entnehmen ist, veränderte WS mit einem IPA / IPM-Zusatz nach Vorbehandlung des SC dessen Mikrostruktur. Die kalorimetrischen Daten weisen auf eine Erhöhung der Fluidität der SC-Lipide nach der Vorbehandlung mit der Formulierung, die mit IPA und IPM angereichert worden war, hin. WAXD-Daten haben allerdings keinen Effekt dieser Hilfsstoffe auf die Lipidpackung des SC gezeigt. Dieses Phänomen kann folgendermaßen erklärt werden. IPA, ein gutes Lösungsmittel, könnte einige Lipide und Proteine aus dem SC extrahieren, IPM, dank seiner ähnlichen Lipophilie zur Ölsäure, könnte deren frühere Positionen einnehmen und so eine neue Ordnung im SC schaffen. Offensichtlich bewirkt diese Neustrukturierung der SC-Lipidmatrix die beste Permeabilität durch das SC für die Kortikosteroide.

Die Kombination von je 5% IPM und IPA eingearbeitet in die wasserhaltige Grundlage Basiscreme DAC führte auch zur Verschiebung der beiden Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen. Diese Verschiebung ist hauptsächlich durch den Einfluss des Wassers auf das SC zurückzuführen. Die Verschiebungen der beiden Phasenübergangstemperaturen nach der Behandlung des SC mit Basiscreme + IPA/IPM waren höher als die in der Literatur [Leopold und Lippold, 1995a] als statistisch signifikant angegebenen 3 °C und konnten deswegen als Hinweis auf eine Veränderung der SC-Mikrostruktur angesehen werden.

Die Ergebnisse von kalorimetrischen Untersuchungen an mit Soventol® Creme, Thermogel [Grüning und Müller-Goymann, 2006], Müstella Creme und Variation IV behandelten SC wiesen eine eindeutige Veränderung der Hornschichtstruktur nach der Behandlung des SC auf. Diese starken Veränderungen, die Soventol® Creme verursacht hat, sind mit einer kombinierten Wirkung von IPA und IPM verbunden, die die Soventol® Creme enthält. Die beiden Hilfsstoffe könnten eine neue Lipidordnung bewirkt haben, die die Penetration für die Wirkstoffe fördern könnte. Soventol® Creme wurde auch in früheren Arbeiten als perfekte Grundlage für HC-acetat und HC beschrieben [Alberg 1998; Refai und Müller-Goymann, 2002]. Auch das Thermogel führte zu einer Veränderung der SC-Mikrostruktur. Der hohe IPA-Gehalt könnte dabei für eine Erhöhung der Porosität des SC sorgen. Soventol® Creme führte zu stärkeren Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen als Thermogel, darüber hinaus war aus der Creme die höhere Permeationsaktivität feststellbar. Die Behandlung des SC mit Müstella Creme führte zu einer Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen, was auf eine Veränderung der Lipide schließen lässt. Diese Veränderung der SC-Struktur ist nicht allein dem reinen

Wassereffekt, im Sinne einer Hydratationssteigerung zuzuschreiben sondern außerdem darauf zurückzuführen, dass das Nerzöl als Bestandteil der Rezeptur die Lipidorganisation beeinflussen könnte. Das reine Nerzöl führte zur Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen und zeigte damit einen Effekt auf die Veränderung der Lipidorganisation im SC. Allerdings bedeutet die Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen nicht generell eine bessere Permeation der Substanzen. Wie in der vorliegenden Arbeit bereits am Beispiel von IPM besprochen wurde, führte der Ester auch zu deutlichen Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen zu niedrigeren Temperaturen, gleichzeitig wurde IPM jedoch als penetrationshemmender Hilfsstoff für BM-17-V eingestuft. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den früher beschriebenen Permeationsergebnissen von Brinkmann und Müller-Goymann (2003). Sie hat eine Permeationsabnahme für HC aus der WHS mit IPM-Zusatz festgestellt.

Variation IV wurde auf der Basis der Zusammensetzung der Müstella Creme mit anderen Bestandteilverhältnissen hergestellt. Auch diese Zubereitung führte zur Veränderung der Lipidorganisation. Diese Veränderungen sind mit einer kombinierten Wirkung von Ethanol und Nerzöl sowie mit dem Wassereffekt verbunden, die die Variation IV enthält.

WAXD-Daten zeigten jedoch keine Veränderung der Netzebenenabstände nach Behandlung des SC mit den Zubereitungen, die eine Kombination aus IPA/IPM sowie eine Kombination aus Nerzöl/Ethanol enthielten.

5.5. Permeation durch organotypische Hautäquivalente

Als Alternative zum Stratum corneum wurden organotypische Hautäquivalente, kurz ASC (artificial skin constructs) untersucht, die in den letzten Jahren großes Interesse auf sich ziehen. Besonders interessant sind sie für den pharmazeutischen Bereich (Permeations- und Metabolisierungsuntersuchungen). Der Vorteil dieser Konstrukte gegenüber Stratum corneum besteht darin, dass ihre Gewinnungs-Konditionen standardisiert sind und nicht von verschiedenen Faktoren, wie Geschlecht, Alter des Spenders und Entnahmestelle der Hautspende abhängig sind.

Ein Ziel der Entwicklung von Hautmodellen ist der Ersatz von „in vivo“- Tests an der Haut von Menschen. Gegen „ex-vivo“- Tests an Zellkulturen spricht, dass nur Primärkulturen der eingesetzten Zellen den Originalzellen im biochemischen Verhalten ähneln. Kulturen verändern sich während ihrer Anzucht zum Teil recht stark, so dass ihr biologisches Profil und ihr biochemisches Verhalten nicht mehr dem der Ausgangszellen entsprechen. Daher lassen Ergebnisse aus „ex vivo“- Tests an Zellkulturen nur eingeschränkte Aussagen in Bezug auf „in vivo“ – Tests am Menschen zu. Trotzdem sollte getestet werden, ob immortalisierte

Keratinocyten, diese wurden für die Kultivierung der Hautkonstrukte eingesetzt, ähnliche Reaktionen und Ergebnisse liefern, wie Permeationsuntersuchungen an exzidiertem humanen SC.

Im Vergleich zum Stratum corneum zeigte ASC sehr schwach ausgeprägte Barriereigenschaften. Die Permeationsrate, d.h. die Menge an permeiertem Arzneistoff pro Zeit, und damit der Flux waren durch Stratum corneum und ASC unterschiedlich. Bei Winkler und Müller-Goymann (2005) lag der Unterschied der Permeationskoeffizienten für ALA-HCl (5-Aminolävulinsäure) aus einer lipophilen Grundlage bei Faktor 64, für ABE (ALA-n-butylester) bei Faktor 142 (jeweils ASC/SC). Für die gleichen Wirkstoffe aus hydrophilen Grundlagen lag der Unterschied bei Faktor 860 bzw. 2800. Bei Specht (1999) lag der Unterschied in den Permeationskoeffizienten für Ibuprofen bei Faktor 20, für Hydrocortisonacetat aus Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe (WHS) bei Faktor 17. Bei Hoffmann und Müller-Goymann (2005) lag der Unterschied in den Permeationskoeffizienten für Clindamycin aus Basocin Akne® Gel bei Faktor 125. Der Faktor ist von der Lipophilie des Arzneistoffes abhängig. Der Fluxunterschied ASC/SC von BM aus der hydrophilen Grundlage liegt bei Faktor 6-12,4, aus der lipophilen Grundlage in der gleichen Ordnung (4,5 bis 12,5). Die geringeren Permeationsunterschiede ASC/SC im Vergleich zu denen anderer Autoren sind mit der hohen Lipophilie des Wirkstoffes verbunden.

Die Permeation von BM durch ASC zeigt aus allen untersuchten Formulierungen eine ähnliche Reihenfolge im Vergleich zur Permeation durch das SC, was auf eine bedingt positive Evaluierung schließen lässt. Bei der SC-Permeation sinkt die permeierte Menge in der Reihenfolge Basiscreme > Celestan-V® Salbe = Soderm® Salbe = WS = Celestan-V® Creme. Bei der ASC-Permeation sinkt die permeierte Menge in der Reihenfolge: Basiscreme = WS > Celestan-V® Creme = Celestan-V® Salbe = Soderm® Salbe. Die Grundlage Basiscreme hat in beiden Fällen die beste Permeabilität im Hinblick auf BM gezeigt, der Flux-Quotient ASC/SC beträgt 6. Die FAM Celestan-V® Salbe und Soderm® Salbe zeigen identische Permeationsverhalten sowohl bei der Permeation durch das SC als auch durch das Hautkonstrukt, der Flux-Quotient ASC/SC ist 4,7. Für die Celestan-V® Creme ist der Flux-Quotient ASC/SC etwas höher (12,4). Das kann durch eine hohe Hydrophilie der Zubereitung (70 % Wasseranteil) und damit durch eine hohe Affinität zu dem Hautkonstrukt erklärt werden. Der relativ hohe Wert von 12,5 für WS ist überraschend und kann auf den oben beschriebenen Erklärungen basieren. Dennoch muss eine gute Affinität der Zubereitung zu dem Hautkonstrukt und damit eine erleichterte Diffusion des Wirkstoffes aus der Zubereitung festgestellt werden. Der Unterschied in der Permeation durch SC und ASC könnte in Zusammenhang mit dem Unterschied in den rheologischen Eigenschaften der Vehikel gesehen werden.

In dieser Arbeit wird erneut gezeigt, dass bei Einsatz von Hautmodellen als Ersatz für humane oder tierische Haut nicht identische Ergebnisse erzielt werden. Diese Ergebnisse stehen damit in Einklang mit Literaturdaten [Schmook et al., 2001]. Wie frühere Literaturdaten jedoch auch gezeigt haben, wurde mit Hautäquivalenten bei einigen Substanzen die gleiche Reihenfolge wie mit exzidiierter humaner Hornhaut ermittelt [Winkler und Müller-Goymann, 2005; Specht, 1999]. Das Hautmodell stellt eine Alternative zur humanen Haut dar, wenn mit diesem die dermale Verfügbarkeit verschiedener Substanzen in der gleichen Grundlage bestimmt wird oder eine hydrophile und lipophile Grundlage für eine einzige Substanz getrennt getestet werden.

Als Fazit lässt sich schließen, dass das verwendete Hautkonstrukt das humane SC nicht vollständig ersetzen kann. Jedoch ist es möglich, durch Experimente mit ASC die Humanhaut-Experimente zu reduzieren. Die geringeren Schwankungen der Permeationsdaten bei den ASC-Experimenten sowie ihre standardisierten Barriereigenschaften machen die Hautmodelle vorteilhafter gegenüber dem SC. Außerdem kann die Verwendung von ASC vorteilhaft sein wie Winkler und Müller-Goymann (2005) berichtet haben, um Hinweise auf einen zellschädigenden Einfluss eines Wirkstoffes auf die in ASC enthaltenen lebenden Keratinozyten zu finden.

5.6. Evaluierung der Hautäquivalente für Biotransformationsuntersuchungen

Hautäquivalente wurden auch für Metabolisierungsuntersuchungen als Ersatz für menschliche Haut vorgeschlagen [Slivka et al., 1993; Slivka, 1992]. *In vitro* Studien mit Haut bzw. mit Hautäquivalenten können zeigen, wie die Biotransformation von topisch applizierten Substanzen in der Haut später bei der Penetration erfolgen kann [Kao et al., 1985]. Ernesti et al. (1992) konnten zeigen, dass 50 % des topisch applizierten Testosterons nach Durchtritt durch das Hautäquivalent metabolisiert werden, wobei das Metabolitenspektrum dem von exzidiierter humaner Vollhaut entspricht. Der Vorteil der Hautäquivalente ist ein schnellerer Ablauf der Wirkstoffbiotransformation als *in-vivo*.

Im Rahmen dieser Studie wurden die Hautäquivalente ASC (TU Braunschweig) verwendet. Als Modellarzneistoff wurde BM-17-V eingesetzt, da dessen Abbauprodukte so wie die Abbaureaktionsreihe bekannt sind und bereits in der Literatur beschrieben wurden. Die Ergebnisse der Biotransformationsuntersuchung zeigen, dass die ASC-Enzyme im schwachsauren und neutralen Medium ab pH 5,5 aktiv sind. BM-17-V unterliegt wie alle Steroid-17-Monoester sowohl unter Säure- als auch unter Basenkatalyse zunächst einer Umlagerung zum C-21-Monoester, da der C-21-Ester thermodynamisch stabiler ist. Dieser Umlagerungsreaktion folgt eine Hydrolyse des C-21-Monoesters zum freien BM. Bei pH < 7 bildet sich BM ebenso schnell wie der C-21-Ester entsteht. Unter alkalischen Bedingungen,

etwa ab pH 7-8, erfolgt die Umlagerungsreaktion wesentlich rascher als die anschließende Hydrolyse. Hansen und Bundgaard (1981) konnten in Phosphatpufferlösungen von pH 7,5 freies BM erst nachweisen, nachdem sich BM-17-V quantitativ zum C-21-Ester umgelagert hatte. Die enzymatische Metabolisierung bei physiologischem pH 7,4 erfolgte nach einer Michaelis-Menten-Kinetik.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass die Hautäquivalente die gleiche Reihenfolge der Reaktionsschritte bei der Biotransformation zeigen wie in der Literatur für Humanhaut beschrieben [Bundgaard und Hansen, 1981]. Darüber hinaus konnten bei den Permeationsuntersuchungen ebenfalls die gleiche Metabolite nachgewiesen werden. Daher stellt das Hautmodell eine gute Alternative zur humanen Haut bei Metabolisierungsuntersuchungen dar.

5.7. Stabilitätsuntersuchungen

Eine unzureichende Stabilität des Wirkstoffes in der Zubereitung kann unterschiedliche Gründe haben: Qualität der Ausgangsstoffe, Inkompatibilitäten mit den Hilfsstoffen der Grundlage, Kontamination der Grundlage oder chemische Instabilität des Wirkstoffes.

BM-17-V ist ein instabiles Kortikoid. In der DAZ (2004) wurde die Rezeptur mit BM-17-V in Basiscreme DAC als Problemrezeptur wegen der Instabilität des Wirkstoffes bezeichnet. Der Wirkstoff wandelte sich in ein weniger wirksames Esterprodukt, das BM-21-Derivat um. Dabei hat die Rezeptur nur 15 % der Wirksamkeit des 17-valerats behalten. Die Stabilität des Wirkstoffes konnte durch die Zugabe von Citratpuffer erhöht werden. In dieser Arbeit wurde die Problematik dieser Rezeptur weiter untersucht, um eine weitere Verbesserung zu erarbeiten.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Stabilität des Wirkstoffes in der Basiscreme unter zwei unterschiedlichen Lagerbedingungen, RT und + 4 °C, untersucht. Weiterhin wurde der Effekt der Reduzierung des Wasseranteils in der Formulierung sowie ein möglicher Effekt der Wechselwirkungen zwischen den Abbauprodukten des 17-Derivats (Betamethason und Prednisolon) auf seine Stabilität untersucht.

Im Laufe der Untersuchung wurde Folgendes festgestellt:

Die Grundlage Basiscreme DAC besitzt im Hinblick auf BM-17-V aufgrund ihres pH-Wertes 6,8 (schwach sauer/ neutral) und des relativ hohen Wasseranteils (40 % (w/w)) eine schlechte Stabilität. Die Halbierung des Wasseranteils in der Grundlage verzögert die Wirkstoffzersetzung, vermeidet sie aber nicht. Eine Lagerung der Zubereitungen bei + 4°C kann den Zersetzungsprozess verzögern. Daher sollte die Verpackung mit einem Hinweis „kühl lagern!“ versehen werden.

6. Zusammenfassung

Die Freisetzung von Betamethason-17-valerat (BM-17-V) aus den Fertigarzneimitteln (FAM) Soderm® Salbe, Celestan-V® Creme erfolgte nach einer Kinetik Pseudo-0. Ordnung, aus Celestan-V® Salbe nach der Quadratwurzel-Kinetik. Die Freisetzung von BM-17-V aus den FAM ähnelte der Freisetzung aus der Wollwachsalkoholsalbe (WS), Hydrophilen Salbe (HS) und der Basiscreme DAC. Von den drei untersuchten BM-17-V-haltigen FAM, besaß die Celestan-V® Salbe das schlechteste Freigabevermögen. Die DAB-Grundlagen haben ebenfalls deutliche Unterschiede in der Freisetzung gezeigt. Die O/W Systeme wie Wasserhaltige Hydrophile Salbe (WHS) und Nichtionische Hydrophile Creme (NHC), sowie das W/O System Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (WWS) zeigten das beste Lösungsvermögen und damit die besten Freisetzungseigenschaften für BM-17-V im Vergleich zu den wasserfreien Salben. Mit zunehmendem Wasseranteil stieg die Liberation des Wirkstoffes aus dem Vehikel. Die Freigabe aus DAB-Grundlagen erfolgte nach einer Mischkinetik.

Alle untersuchten BM-17-V-FAM erwiesen sich hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens durch exzidiertes humanes Stratum corneum (SC) als gleichwertig, während die hergestellten DAB-Grundlagen in ihrem Permeationskurvenverlauf deutlich unterschiedlich waren. Eine gute Permeabilität des Wirkstoffs ergab sich aus WS, WHS und Basiscreme DAC, die schlechteste aus HS und NHC. Die WS war hinsichtlich ihres Permeationsverhalten der Soderm® Salbe ähnlich. Aus der Basiscreme DAC und WHS hat BM-17-V aufgrund der hohen Sättigungskonzentration eine bessere Permeation im Vergleich zu den bereits genannten Formulierungen gezeigt.

Bei der 1:1-Verdünnung des Fertigarzneimittels Soderm® Salbe mit WS wurde trotz Halbierung der Wirkstoffkonzentration keine Reduzierung der Permeation für BM-17-V registriert. Die Verdünnungen der WS mit unterschiedlichen DAB-Grundlagen (1:1) erwiesen sich hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens als gleichwertig. Nur die Verdünnung der WS mit der Basiscreme DAC ergab einen leichten Anstieg der Permeation.

Die Hydrocortison-acetat enthaltende FAM Soventol® Creme wurde ebenfalls für BM-17-V als penetrationsfördernde Grundlage eingestuft. Der permeationsfördernde Effekt von Isopropylalkohol (IPA) und Isopropylmyristat (IPM) wurde in WS, Basiscreme DAC und in einer Nerzölemulsion hinsichtlich der strukturellen Veränderungen der Hornschicht näher untersucht. Während IPM durch die Interaktion mit den Hautlipiden das SC verfestigte und die Betamethason - Permeation reduzierte, erhöhte das eingesetzte IPA die Fluidität der SC-Lipide, sowie die Porosität des SC durch die Extraktion einiger Lipidgruppen. In Kombination wirkten beide Hilfsstoffe synergistisch. Nach der Behandlung des SC mit einer Enhancer-Kombination kam es zu einer Veränderung der SC-Lipidstruktur, welche die

Wirkstoffpermeation begünstigte. Der synergistische Effekt von IPA und IPM wurde im Rahmen der Arbeit für WS und Basiscreme DAC nachgewiesen. Allerdings hatte die Kombination von IPA und IPM in den wasserfreien Formulierungen ein wesentlich höheres Steigerungspotential als in den wasserhaltigen Formulierungen. In der Nerzöl-Emulsion war dieser Effekt sogar nicht nachzuweisen. Der Wirkstoff allein sowie in Kombination mit WS bzw. Basiscreme DAC führte nicht zu Veränderungen der SC-Mikrostruktur, wie DSC- und Röntgenweitwinkeluntersuchungen gezeigt haben.

In den Permeationsuntersuchungen wurde ein synergistischer Effekt für die weitere Kombination Nerzöl/Ethanol gezeigt. Hinsichtlich des Einflusses auf die SC-Struktur wurden nerzöhlhaltige Emulsionen, die sich an der qualitativen Zusammensetzung der Müstella Creme orientierten und Nerzöl als Triglyceride bzw. Ethanol als permeationsmodifizierende Stoffe enthielten, charakterisiert. Die DSC-Daten deuteten darauf hin, dass der strukturverändernde Effekt vom Nerzöl ausgeht. In der Kombination waren beide Hilfsstoffe in einer Modellrezeptur in der Lage, zu einer Veränderung der Lipidorganisation und parallel zu einer Penetrationserhöhung zu führen.

Eine weitere Steigerung der dermalen Verfügbarkeit durch die Modifizierung der letztgenannten Grundlage mit anderen Enhancern konnte nicht erreicht werden. Die Zugabe von IPA und IPM führte zu keiner Veränderung des Permeationsverhaltens. Die Zugabe von DMSO und Propylenglykol verschlechterte die Permeation des Wirkstoffs wesentlich. Die kommerzielle Nerzölemulsion wurde mit den HC-haltigen Fertigarzneimitteln hinsichtlich der Permeation für HC verglichen. Es wurden keine Unterschiede festgestellt.

Die Barriereigenschaften von ASC waren geringer als bei SC, darüber hinaus resultierte eine erhöhte Permeation für den Wirkstoff. Die Permeationsreihenfolge für ASC war teilweise ähnlich wie für SC. Der Fluxunterschied ASC/SC von BM lag für die hydrophilen Grundlagen bei Faktor 6-12,4, für die lipophilen Grundlagen in der gleichen Größenordnung von 4,5 bis 12,5. Dennoch ist der Einsatz von ASC nur zu empfehlen, wenn wasserhaltige und wasserfreie Formulierungen getrennt analysiert werden. Sinnvoll ist der Einsatz von ASC für Permeationsstudien mit Glukokortikoiden aufgrund der Durchführung der Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen.

Abschließend wurde die metabolische Aktivität der Hautäquivalente bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Ab pH 5,5 waren die ASC enzymatisch aktiv und förderten eine schnelle Hydrolyse des BM-17-V über das 21-Derivat zu BM.

Hinsichtlich der Stabilität des Wirkstoffes in den wasserhaltigen Zubereitungen wurde festgestellt, dass bei niedriger Temperatur (+4°C) die Umesterung des BM-17-V in BM-21-V auch bei pH 5,5-7,0 deutlich reduziert werden konnte. Daher ist es sinnvoll, die hergestellte

wasserhaltige dermale Zubereitung im Kühlschrank zu lagern, um einen Abbau in einen schwach- bzw. unwirksamen Metaboliten zu vermeiden.

7. Literaturverzeichnis

- Alberg U.**, Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB mit suspendiertem Hydrocortisonacetat – Einfluss von Ethanol auf die Mikrostruktur der Cremes, Arzneistofffreigabe und Arzneistoffpermeation durch humanes Stratum corneum, Dissertation TU Braunschweig (1998)
- Alberg U., C. C. Müller-Goymann**, Modified water containing hydrophlic ointment with suspended hydrocortisone-21-acetate, the influence of the microstructure of the cream on the in vitro drug release and in vitro percutaneous penetration, Eur. J. Pharm. Biopharm., 47(2) (1999) 139-143
- Anderson B. D., Higuchi W. I., Raykar P.V.**, Heterogeneity effects on permeability – partition coefficient relationships in human stratum corneum, Pharm. Res. 5(9) (1988) 566-573
- Anderson B. D., Taphouse V.**, Initial rate studies of hydrolysis and acyl migration in methylprednisolone-21-hemisuccinate and 17-hemisuccinate, J. Pharm. Sci., 70 (1981) 181-186
- Arellano A., Santoyo S., Martin C., Ygartua P.**, Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. Eur. J. Pharm. Sci., 7(2) (1999) 129-35
- Bach M., Lippold B. C.**, Influence of penetration enhancers on the blanching intensity of betamethasone 17-benzoate, Int. J. Pharm. 168 (1998) 97-108
- Barry B. W.**, Penetration enhancers; mode of action in human skin, Pharmacol. Skin, 1 (1987,a) 121-137
- Barry B. W.**, Mode of action of penetration enhancers in human skin, J. Controlled Release, 6 (1987,b) 85-97
- Barry B. W., Bennet S. L.**, Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin, J. Pharm. Pharmacol. 39 (1987) 535-546
- Barry B. W.**, Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement, J. Controlled. Release, 15 (1991) 237-247
- Bauer K. H., Frömming K. H., Führer C.**, Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7. Auflage (2002)
- Beastall J. C., Hadgraft J., Washington C.**, Mechanism of action of azone as a percutaneous penetration enhancer: lipid bilayer fluidity and transition temperature effects, Int. J. Pharm., 43 (1988) 207-213
- Bickers D. R., Hazen P. G., Lynch W. S.**, Clinical pharmacology in skin disease. New York, Churchill Livingstone (1984)
- Block L. H., Vetter W., Siegenthaler W.**, Immunpharmakologie der Kortiko-steroiden, Klinische Wochenschrift, 60 (1982) 1373-1384

- Blume B.**, Untersuchung der perkutanen Resorption von Betamethason-17, 21-dipropionat aus verschiedenen galenischen Formulierungen am in vitro-Modell des isoliert perfundierten Rindereuters. Dissertation Universität Leipzig (1996)
- Bouwstra J. A., Peschier L. J. C., Brussee J., Bodde H. E.**, Effect of N-alkyl-azocycloheptan-2-ones including azone on the thermal behaviour of human stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, 52 (1989) 47-54
- Bouwstra J. A., Vries M. A., Gooris G. S., Bras W., Brussee J., Ponec M.**, Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier, *J. Contr. Release*, 15 (1991) 209-220
- Bouwstra J. A., Gooris G. S., van der Spek J. A., Bras W.**, Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering, *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991) 1005-1012
- Bouwstra J. A., Gooris G. S., Salomons-de Vries M. A., van der Spek J. A., Bras W.**, Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: a wideangle X-ray diffraction study, *Int. J. Pharm.* 84 (1992a) 205-206
- Bouwstra J. A., Gooris G. S., Brussee J., Salomons-de Vries M. A., Bras W.**, The influence of alkylazones on the ordering of the lamellae in human stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 79 (1992 b) 141-148
- Bouwstra J. A.**, The skin, a well-organized membrane. *Colloids surfaces A: physicochem. Eng. Aspects* 123-124 (1997) 403-413
- Bouwstra J. A., Gooris G. S., Dubbelaar F. E. R., Weerheim A. M., Ijzerman A. P., Ponec M.**, Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids, *J. of Lipid Research.*, 39 (1998) 186-196
- Bouwstra J. A., Dubbelaar F. E., Gooris G. S., Ponec M.**, The lipid organization in the skin barrier, *Acta Derm. Venereol. Suppl.*, 208 (2000) 23-30
- Bouwstra J. A., Pilgram G., Gooris G. S., Koerten H., Ponec M.**, New aspects of the skin barrier organization, *Skin. Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.*, 14 (2001a) 1-36
- Bouwstra J. A., Gooris G. S., Dubbelaar F. E. R., Ponec M.**, Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases, *J. Lip. Res.*, 42 (2001b) 1759-1770
- Bouwstra J.A., Jager M., Gooris G.S., Ponec M.**, A novel stratum corneum substitute for screening of active ingredients, (2006) Abstract, Versal, France
- Brain S. D., Williams T. J.**, Prostaglandins, leukotrienes, related compounds and their inhibitors. In: Greaves, M.W., Shuster, S., *Pharmacology of the skin. Hdb. Exp. Pharmacol.* 87/1 Berlin, (1989) 347-366
- Brand R. M., Jendrzewski J. L., Henery E. M., Charron A. R.**, A Single Oral Dose of Ethanol Can Alter Transdermal Absorption of Topically Applied Chemicals in Rats, *Toxicol. Sciences* 92 (2) (2006) 349-355
- Brinkmann I., C. C. Müller-Goymann**, Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across the human stratum corneum, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 16 (2003) 393-404

- Brinkmann I., C. C. Müller-Goymann**, An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum, *Pharmazie* 60 (2005) 215-220
- Brinkmann I.**, Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von Hydrocortison und Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum und ein organotypisches Hautkonstrukt, Dissertation TU Braunschweig (2006)
- Bundgaard H., Hansen J.**, Studies on the stability of corticosteroids. VI. Kinetiks of the rearrangement of betamethasone-17-valerate to the 21-valerate ester in aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, 7 (1981) 197-203
- Cha B. J., Lee E. D., Kim W. B., Chung S. J., Lee M. H., Shim C. K.**, Enhanced skin permeation of a new capsaicin derivative (DA-5018) from a binary vehicle system composed of isopropyl myristate and ethoxydiglycol, *Arch. Pharm. Res.*, 24(3) (2001) 224-228
- Cheung Y. W., Li Wan Po A., Irwin W. J.**, Cutaneous biotransformation as a parameter in the modulation of the activity of topical corticosteroids, *Int. J. Pharmaceutics*, 26 (1985) 175-189
- Chien Y. W., Xu H. L., Chiang C. C., Huang Y. C.**, Transdermal controlled administration of indomethacin. I. Enhancement of skin permeability. *Pharm. Res.*, 5 (1988) 103-106
- Cornwell P. A., Barry B. W., Stoddart C. P., Bouwstra J. A.**, Wide-angle X-ray diffraction of stratum corneum: effects of hydration and terpene enhancer treatment, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 938-950
- Daniels R.**, Kranke Haut braucht viel Pflege, *PZ* 152 (8) (2007) 62-65
- Danon A., Assouline G.**, Inhibition of prostaglandin biosynthesis by corticosteroids requires RNA and protein synthesis. *Nature* 273 (1978) 552-554
- Deutsche Apothekerzeitung (DAZ)**, Problemrezeptur Betamethasone-17-valerat 144/15 (2004) 67-68
- DAB 9 Kommentar**: DAB, 9. Ausgabe, K. Hartke und E. Mutschler, Wissenschaftliche Verlag-Ges. Frankfurt (Main): Govi-Verlag (1986)
- Dooms, Goossens A., Verschaeve H., Degreef H., van Berendoncks**, Contact allergy to hydrocortisone and thixocortol pivalate: problems in the detection of corticosteroid sensitivity, *Contact. Dermatitis*, 14 (1986) 94-102
- Downing D.T., Abraham W., Wegner B. K., Willmann K. W., Marshall J. L.**, Partition of sodium dodecyl sulfate into stratum corneum lipid liposomes, *Arch. Dermatol. Res.*, 285 (1993) 151-157
- Dunn C. J., Willoughby D. A.**, The inflammatory response - a review. In: Greaves, M.W., Shuster, S.: *Pharmacology of the skin. Hdb. Exp. Pharmacol.* 87/1. Berlin (1989) 465-477
- Eberhardt W., Kilz T.**, Molekulare Grundlagen der Glucocorticoidwirkung. *Pharm. Unserer Zeit*, 32 (2003) 288-294
- Elias P. M.**, Epidermal lipids, barrier function and desquamation, *J. Invest. Dermatol.*, 80 (1983) 44-49

- Elias P.M.**, The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier in: Osborne, DW, Amann, A.H (Hrsg.), Topical drug delivery formulations, Marcel Dekker Inc. New York: 13-28 (1990)
- El-Kattan, A. F., Asbill, C. S., Kim, N., Michniak, B. B.**, Effect of Formulation Variables on the Percutaneous Permeation of Ketoprofen from Gel Formulations. *Drug Deliv.* 7, (2000) 147-153.
- Europäisches Arzneibuch**, 4. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Goviverlag-Pharmazeutischer Verlag Eschborn (2002)
- Ernesti A.M., Swiderek M., Gay R.**, Absorption and metabolism of topically applied testosterone in an organotypic skin culture, *Skin. Pharmacol.* 5 (1992) 146-153
- Fiedler H.P.**, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Band 1, 4. Ausgabe, Editio Cantor Verlag, Aulendorf (1996)
- Forslind B.**, Domain mosaic model of the skin barrier, *Acta Derm. Venereol.* 74 (1994) 1-6
- Flower R. J.**, Macrocortin and the antiphospholipase A2 proteins, *Adv. Inflamm. Res.* 8 (1984) 1-34
- Flower R.J.**, Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A2. In: Schleimer, R.P., Claman, H., Oronsky, A., Antiinflammatory steroid action: Basic and clinical aspects. New York, Academic Press, (1989) 48-66
- Francoeur M. L., Golden G. M., Potts R. O.**, Oleic acid: its effects on stratum corneum in relation to (trans) dermal drug delivery, *Pharm. Res.* 7 (6) (1990) 621-627
- Franz T. J.**, Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data, *J. Invest. Dermatol.* 64 (3) (1975) 190-195
- Freeman S.**, Corticosteroid allergy, *Contact-Dermatitis* 33 (1995) 240-242
- Friberg S. E., Osborne D. W.**, Small angle X-ray diffraction patterns of stratum corneum and a model structure for its lipids, *J. Disp. Tech.* 6 (1985a) 485-495
- Friberg S. E., Osborne D.W.**, Tombridge, T.L., X-ray diffraction study of human stratum corneum, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 36 (1985b) 349-354
- Fröhlich M.**, Elektronenmikroskopische und physikalische Untersuchungen an Hautmodellen aus humanen Stratum corneum Lipiden und topischen phospholipidhaltigen Wirkstoff-Formulierungen, Dissertation Universität Karlsruhe (2000)
- Führer C., Junginger H., Friberg S.**, Strukturuntersuchungen an Salben, 1. Mitteilung: Röntgenuntersuchungen an der Hydrophilen Salbe DAB 7, *J. Cosmet. Chem.* 29 (1978) 703-716
- Gardi R., Vitali R., Ercoli A.**, Derivati di condensazione nelle catena laterale di corticosteroidi. Nota III. Preparazione e reazioni dei 17-monoesteri, *Gazz. Chim. Ital.* 93 (1963) 431-450
- Garson J. C., Doucet J., Leveque J. L., Tsoucaris G.**, Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction, *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 43-49
- Gay G., Ruiz-Sanz J., Fersht A. R.**, Generation of a family of protein fragments for structure folding studies 1. folding complementation of 2 fragments of chymotrypsin inhibitor 2 formed by cleavage at its unique methionine residue, *Biochemistry* 33 (1994) 7964-7970

- Gene de Pasquale, Rassaert C. L., Mc Dougall E.**, The local anti-inflammatory properties of betamethasone 17-benzoate and 6,9-difluoroprednisolone 21-acetate 17-butyrate, *Steroids*, 16 (1970) 679-692
- Gerdes S., Mrowietz U.**, Klassische Therapien der topischen Psoriasisbehandlung, *Hautarzt* 2006, 57 (2006) 666-671
- Glombitza B.**, Lipidsysteme als Stratum corneum Modelle. Charakterisierung und Eignung für Permeationsuntersuchungen, Dissertation, TU Braunschweig (2001)
- Goffin V., Henry F., Pierard-Franchimont C., Pierard G. E.**, Penetration enhancers assessed by corneoxenometry, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 13 (2000) 280-284
- Golden G. M., Guzek D. B., Mkie J. E., Potts R. O.**, Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 86(3) (1986) 255-259
- Golden G. M., Mckie J. E., Potts R. O.**, Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux, *J. Pharm. Sci.*, 76 (1987) 25-28
- Goldsmith P., Burtn J. L., Staughton R. C. D.**, Immunosuppressive (cytotoxic) and immunostimulant drugs. In: Greaves, M.W., Shuster, S., *Pharmacology of the skin. Hdb. Exp. Pharmacol.* 87/2, Berlin (1989) 307-327
- Greaves M. S.**, The in vivo catabolism of cortisol by human skin, *J. Invest. Dermatol.* 57 (1971) 100-107
- Grüning N., Müller-Goymann C. C.**, Differential scanning calorimetry of human stratum corneum treated with a semisolid system named thermogel, its components and combination there of, 5th World Meeting Pharm. Biopharm. Pharm. Technol. (2006) Abstract, Geneva
- Gungor S., Bergisadi N.**, Effect of penetration enhancers on in vitro percutaneous penetration of nimesulide through rat skin. *Pharmazie*, 59 (2004) 39-41
- Gysler A.**, Verschiedene Untersuchungen zu Biotransformation und Penetrationsverhalten halogenierter und nicht halogenierter topischer Glukokortikoide, Dissertation Freie Universität Berlin (1998)
- Hadgraft J.**, Modulation of the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 14 (2001) 72-81
- Harrison J. E., Groundwater P. W., Brain K. R., Hadgraft J.**, Azone induced fluidity in human stratum corneum. A fourier transform infrared spectroscopy investigation using the perdeuterated analogue, *J. Controlled Release*, 41 (1996,a) 283-290
- Harrison J. E., Watkinson A. C., Green D. M., Hadgraft J., Brain K.**, The relative effect of azone and transcutol on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum, *Pharm. Res.*, 13 (1996,b) 542-546
- Hauck G.**, Hornschichtlipide: Methoden zu ihrer Bestimmung sowie ihr Einfluss auf die Penetration von Flufenaminsäure in das Stratum corneum, Dissertation Universität Saarbrücken (1994)
- Häusler Franz Xaver**, Untersuchungen zur Kristallographie und Kolloidstruktur von pharmazeutisch genutzten Paraffinen und Vaseline, Dissertation, TU Braunschweig (1989)

- Hein R., Korting H. C., Mehring T.**, Differential effect of medium potent nonhalogenated double-ester-type and conventional glucocorticoids on proliferation and chemotaxis of fibroblasts in vitro, *Skin. Pharmacol.*, 7 (1994) 300-306
- Higgs G. A., Moncada S., Vane J. R.**, The role of arachidonic acid metabolites in inflammation. *Adv. Inflamm. Res.* 1 (1979) 413-418
- Higuchi W. I.**, Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.* 51(8) (1962) 802-804
- Hikima T., Ohno Y., Maibach H. I.**, Metabolism of prednisolone 21-acetate in hairless mouse skin, *Skin. Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 14 (2001) 203-209
- Hikima T., Maibach H. I.**, Distribution of hydrolytic activity catalyze the biotransformation of prednisolone 21-acetate in human skin, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 14 (2001) 196-202
- Hill J. R., Wertz P. W.**, Molecular model of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (2003) 121-126
- Hirvonen J., Rajala R., Vihervaara P., Laine E., Paronen P., Urtti A.**, Mechanism and reversibility of penetration enhancers action in the skin. A DSC study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 40(2) (1994) 81-85
- Hoffmann C., C. C. Müller-Goymann**, Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate, *Pharmazie*, 60 (2005) 350-353
- Höger und Schön**, Kranke Haut braucht viel Pflege, *PZ* 152 (8) (2007) 62-65
- Hopsu-Havu V. K., Saarni H.**, Wirkungen von Glukokortkoiden auf die In-vitro-Synthese von Hyaluronsäure, sulfatierten Glykosaminoglykanen und Kollagen, *Akt. Dermatol.*, 6 (1980) 83-90
- Horne D. C.**, A medical library for the public: starting and running a consumer health library, *North. Carolina Libraries.* 57(3) (1999) 110-113
- Hsia S. L., Hao Y. L.**, Metabolic transformations of cortisol-4-(¹⁴C) in human skin, *Biochemistry*, 5 (1966) 1469-1474
- Iliev D., Hinnen U., Elsner P.**, Skin roughness is negatively correlated to irritation with DMSO, but not with NaOH and SLS., *Exp. Dermatol.*, 6 (1997) 157-160
- Jäckle E.**, Stratum corneum analoge Lipidmischungen als Diffusionsmedien, ihre Eigenschaften und deren Beeinflussung durch Salbengrundlagen, *Dissertation Universität Saarbrücken* (1996)
- Jaekle E., Schaefer U. F., Loth H.**, Comparison of effects of different ointment bases on the penetration of ketoprofen through heat-separated human epidermis and artificial lipid barriers, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1396-1406
- Jager M. W., Gooris G. S., Dolbnya I. P., Bras W., Ponc M., Bouwstra J. A.**, Novel lipid mixtures based on the synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization, *J. Lipid. Res.*, 45 (2004) 923-932
- Jiang J., Wang R. K.**, Comparing the synergistic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue in vitro, *Phys. Med. Biol.*, 49 (2004) 5283-5294

- Jiang J., Zhang L., Wang R. K.**, Synergistic effect of hyperosmotic agents under topical application on optical clearing of skin tissue in vitro, *Med. Phys.* Submitted (2004)
- Jiang S. J., Zhou X. J.**, Examination of the mechanism of oleic acid-induced percutaneous penetration enhancement: an ultrastructural study, *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (2003) 66-68
- Junginger H.**, Kristalline Gelstrukturen in Cremes, *Deutsche Apotheker Zeitung* 131 (1991) 1933-1941
- Junginger H., Heering W., Führer C., Geffers I.**, Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den kolloidchemischen Aufbau von Salben und Cremes, *Coll. Polym. Sci.* 259 (1981) 561-567
- Kalbitz J., Neubert R., Wohlrab W.**, Modulation of drug penetration in the skin, *Pharmazie*, 51 (1996) 619-637
- Kao J., Patterson F. K., Hall J.**, Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1985) 502-516
- Kiselev M. A., Ryabova N. Y., Balagurov A. M., Dante S., Hauss T., Zbytovska J., Wartewig S., Neubert R. H. H.**, New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction, *Eur. Biophys. J.* 34 (2005) 1030-1040
- Kligman A. M., Christophers E.**, Preparation of isolated sheets of human stratum corneum, *Arch. Dermatol.*, 88 (1963) 702-705
- Knutson K., Potts R. O., Golden G. M., McKie J. E., Lambert W. J., Higuchi W. I.**, Macro- and molecular physical-chemical considerations in understanding drug transport in the stratum corneum, *J. Contr. Rel.*, 2 (1985) 67-87
- Kobayashi Y., Nakamura H., Sugibayashi K., Morimoto Y.**, Estimation of action site of L-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate mixed system for its enhancing effect on the skin permeation of ketotifen, *Int. J. Pharm.*, 156 (1997) 153-162
- Kooyman D. J.**, Lipids of the skin, Some changes in the lipids of the epidermis during the process of keratinisation, *Arch. Dermatol. Physiol*, 25 (1932) 444-450
- Korting H. C., Hülsebus E., Kerscher M., Greber R., Schäfer-Korting M.**, Discrimination of the toxic potential of chemically differing topical glucocorticoids using a neutral red release assay with human keratinocytes and fibroblasts, *Br. J. Dermatol.*, 133 (1995) 54-59
- Korting H. C., Maslen K., Gross G., Willers C.**, Comparison of activity of different topical corticosteroid creams and ointments using a vasoconstriction assay: superiority of hydrocortisone butyrate over hydrocortisone, *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 3 (5) (2005) 348-353
- Kriwet K., Parenteau N. L.**, In vitro skin models, *Cosmet. Toiletries* 111 (1996) 93-102
- Kubota K., Maibach H. I.**, In Vitro Percutaneous permeation of Betamethasone and Betamethasone 17-Valerate, *J. Pharm. Sci.*, 82 (10) (1993) 1039-1045
- Kurihara-Bergstrom T., Knutson K., De Noble L. J., Goates C. Y.**, Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin, *Pharm. Res.*, 7(7) (1990) 762-766

- Lampe M. A., Burlingame A. L., Whitney J., Williams M. L., Brown B. E., Roitman E., Elias P. M.,** Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations, *J. Lipid. Res.*, 24 (1983) 120-130
- La Pointe M. C., Baxter J. D.,** Molecular biology of glucocorticoid hormone action. New York, Academic. Press, (1989) 3-29
- Lazo N. D., Meine J. G., Downing D. T.,** Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as β -sheet: A solid-state nuclear magnetic resonance study, *J. Invest. Dermatol.*, 105 (1995) 296-300
- Leopold C. S., Lippold B. C.,** An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC). *J. Pharm. Pharmacol.*, 47 (1995a) 276-281
- Leopold C. S., Lippold B. C.,** Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration on methyl nicotinate in vivo, *J. Pharm. Sci.*, 84 (2) (1995b) 195-198
- Lesiewicz J., Morrison D.M., Goldsmith L.A.,** Ornithine decarboxylase in rat skin: 2. differential response to hair plucking and a tumor promoter, *J. Invest. Dermatol.*, 75 (1980) 411-416
- Lippold B. C., Schneemann H.,** The influence of vehicles on the local bioavailability of betamethasone-17-benzoate from solution- and suspension-type ointments, *Int. J. Pharm.*, 22 (1984) 31-43
- Lloyd D. H.,** Inflammatory mediators and skin disease, In: *Advances in veterinary dermatology*, 1 (1990) 163-175
- Loth H., Holla-Benninger A., Hailer M.,** Untersuchungen der Arzneistoffliberation aus Salben, *Pharm. Ind.*, 41 (1979) 789-796
- Loth H.,** In vitro-Modelle für die Arzneistoffliberation aus Salben, *Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1979) 49-56
- Loth H.,** Arzneistoffliberation aus Salben, *Zeitschrift für die Verarbeitung von Chemierohstoffen, Industriehilfsmitteln, Lösungsmitteln - Wachs- und Harzverarbeitung*, (1981) 15-19
- Loth H.,** Pharmazeutische und dermale Verfügbarkeit von Arzneistoffen aus Salben, *Krankenhauspharmazie*, 3 (1982) 83-89
- Loth H.,** Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen, II, *Acta Pharm. Technol.*, 33 (1987) 3-14
- Loth H.,** Skin Permeability, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 11 (3) (1989) 155-164
- Loth H.,** Vehicular influence on transdermal drug penetration, Invited Review, (1991), *Int. J. Pharm.*, 68, 1-10
- Lubach D., Kietzmann M.,** Lehrbuch Dermatokortikoide, *Pharmakologie und Therapie* (1992)
- Marshall L. A., Chang J. V.,** Pharmacological control of phospholipase A2 activity in vitro and in vivo, Plenum Press, New York (1990) 169-182
- Maruyama S., Suzuki H.,** A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein, *Agric. Biol. Chem.*, 46 (1982) 1393-1394

- McIntosh T.**, Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol, *Biophys. J.*, 85 (2003) 1675-1681
- Melnik B. C., Hollmann J., Erler E., Verhoefen B., Plewig G.**, Microanalytical screening of all major stratum corneum lipids by sequential high-performance thin layer chromatography; *J. Invest. Dermatol.* 92 (1989) 231-234
- Montenegro L., Ademola J. I., Bonina F. P., Maibach H. I.**, Effekt of application time of betamethasone-17-valerate 0,1% cream on skin blanching and stratum corneum drug concentration, *Int. J. Pharm.*, 140 (1996) 51-60
- Moore D. J., Rerck M. E.**, Insights into the molecular organisation of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models, *Acta. Derm. Vener.. Suppl.*, 208 (2000) 16-22
- Moser K., Kriwet K., Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H.**, Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52 (2001) 103-112
- Nakano M., Nishiuchi M., Takeuchi M., Yamada H.**, Correlation between metabolism of betamethasone 17,12-dipropionate and adrenal hypertrophy in rat fetuses, *Steroids*, 37 (5) (1981) 511-525
- Nanayakkara G. R., Bartlett A., Forbes B., Marriott C., Whitfield P. J., Brown M. B.**, The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants, *Int. J. Pharm.* 301 (2005) 129-139
- Narasimha M. S., Zhao Y. L., Hui S. W., Sen A.**, Synergistic effect of anionic lipid enhancer and electroosmosis for transcutaneous delivery of insulin, *Int. J. Pharm.*, 326 (2006) 1-6
- Naray-Fejes-Toth A., Fejes-Touth G., Fischer C., Frölich J. C.**, Effect of dexamethasone on in vivo prostanoid production in the rabbit, *J. Clin. Invest.* 74 (1984) 120-123
- Neubert R. H. H., Pöttsch A.**, Topische Verfügbarkeit von Hydrocortisonacetat aus handelsüblichen halbfesten Formulierungen, *Pharmazie* 59 (2004) 472-474
- Neumayer I.**, Chemische Stabilität von Wirkstoffen in Dermatika in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Grundlage, Dissertation Universität München (1999)
- Niedner R., Ziegenmeyer J.**, Dermatika, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, (1992) 267, 272
- Norlen L., Nicander I., Rozell B. L., Ollmar S., Forslind B.**, Inter- and intraindividual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo, *J. Invest. Dermatol.*, 112 (1999) 72-77
- Norlen L.**, Skin barrier formation: the membrane folding model, *J. Invest. Dermatol.*, 117 (2001) 823-829
- Odland G. F.**, Structure of skin, in: *Biochemistry and physiology of the skin*, Goldsmith, L.A. (Ed.), Oxford university press., Oxford, (1983) 3-63
- Ongpipattanakul B., Burnette R. R., Potts R. O., Francoeur M. L.**, Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids, *Pharm. Res.*, 8 (3) (1991) 350-354

- Panchagnula R., Desu H., Jain A., Khandavilli S.**, Feasibility studies of dermal delivery of paclitaxel with binary combinations of ethanol and isopropyl myristate: role of solubility, partitioning and lipid bilayer perturbation, *Farmaco* 60 (2005) 894-899
- Parillo J. E., Fauci A. S.**, Mechanism of glucocorticoid action on immune responses, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19 (1979) 179-201
- Pecegheiro M.**, Contact allergy to topical corticosteroids: a screening study with a corticosteroid mix. Portuguese Contact dermatitis Research Group (GPEDC) *Contact.-Dermatitis*.33 (1995) 196-197
- Pellanda C., Strub C., Figueiredo V., Ruffli T., Imanidis C., Surber C.**, Topical Bioavailability of Triamcinolone Acetonide: Effect of Occlusion, *Skin Pharmacol. Physiol.* 20 (2007) 50-56
- Perlia X.**, Stability and stabilization of drugs. II. Physical viewpoints, *Pharm. Acta. Helv.*, 42 (5) (1967) 265-302
- Pillai O., Panchagnula R.**, Transdermal Iontophoresis of Insulin, *Skin Pharmacol. Physiol.* 17 (2004) 289-297
- Po A. L. W., Irwing W. J., Yip Y. W.**, High-performance liquid chromatographic assay of betamethasone 17-valerate and its degradation products, *J. Chromatogr.*,176 (1979) 399-405
- Polano M. K., Ponec M., Smeenk G., Hendrikse J. C. M.**, Factors influencing the penetration of corticosteroids through the epidermis, *Advances in biology of skin*, vol.XII, (1972) 325-338
- Ponec M.**, Wirkung der Kortikosteroide auf das Wachstum und auf die Kollagensynthese von kultivierten menschlichen Hautfibroblasten, *Akt. Dermatol.*, 6 (1980) 91-101
- Ponec M., Cibbs S., Pilgram G., Boelsma E., Koerten H., Bouwstra J., Mommaas M.**, Barrier Funktion in Reconstructed Epidermis and its Resemblance to native Human Skin, *J. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol*, 14 (2001) 63-71
- Potts R. O., Francoer M. L.**, The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J. Invest. Dermatol*, 96 (1991) 495-499
- Potts R. O., Mak V. H. W., Guy R. H., Francoeur M. L.**, Strategies to enhance permeability via stratum corneum lipid pathways, *Adv. Li. Res.*, 24 (1991) 173-210
- Potts R. O., Guy R. H.**, Predicting skin permeability, *Pharm. Res.*, 9 (1992) 663-669
- Prausnitz M. R., Mitragotri S., Langer R.**, Current status and future potential of transdermal drug delivery, *Nat. Rev. Drug Diskov.*, 3 (2004) 115-124
- Radoja N., Komine M., Jho S. H., Blumenberg M., Tomic-Canie M.**, Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 4328-4339
- Ranade V. V.**, Drug delivery systems. 6. Transdermal drug delivery, *J. Clin. Pharmacol.*, 31 (1991) 401-418
- Raudenkolb S.**, Untersuchungen zur strukturellen und physikochemischen Charakterisierung von Stratum corneum Lipiden und deren Mischsystemen, Dissertation Martin-Luther Universität Halle-Wittenburg (2002)
- Redoules D., Tarroux R., Perie J.**, Epidermal enzymes, their role in homeostasis and their relationships with dermatoses, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 11 (1998) 183-192

- Refai H., C. C. Müller-Goymann**, Larvated incompatibilities of hydrocortisone cream preparations upon dilution with different cream bases. *Pharmazie* 54 (1999) 754-758
- Refai H., C. C. Müller-Goymann**, The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 143-150
- Refai H.**, Studies on the parameters affecting hydrocortisone release and permeation through excised human stratum corneum with emphasis on the influence of dilution, Dissertation Technische Universität Braunschweig (2001)
- Ring J.**, Spezifische Wirkstoffe in der dermatologischen Therapie, *Pharm. In unserer Zeit*, 5 (1982) 139
- Rippe M.**, Optimierung einer mikrobiellen Dehydrogenierung von hydrocortison zu Prednisolon, Dissertation (1973)
- Rivara G., Tomb R. R., Foussereau J.**, Allergic contact dermatitis from topical corticosteroids, *Contact. Dermatitis*, 21 (1989) 83-91
- Rojas J., Falson F., Couarragze G., Francis A., Puisieux F.**, Optimization of binary and ternary solvent systems in the percutaneous absorption of morphine base, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1 (1991) 70-75
- Robson K. J., Stewart M. E., Michelsen S., Lazo N. D., Downing D. T.**, 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides, *J. Lipid. Res.*, 35 (1994) 2060-2068
- Rowat A. C., Kitson N., Thewalt J. L.**, Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by ^2H NMR, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 225-231
- Ruland A., Rohr U., Kreuter J.**, Transdermal delivery of the tetrapeptide Hisetal (melanotropin (6-9)) and amino acids: their contribution to the elucidation of the existence of an "aqueous pore" pathway, *Int. J. Pharm.* 107 (1994) 23-28
- Samson C., Peets E., Winter-Sperry R., Wolkoff H.**, Betamethasone Valerate – Valisone Establishment of a New Standart for Topical Corticosteroid Potency, Maibach HI, Surber C (eds): *Topical Corticosteroids*. Basel, Karger (1992) 335-348
- Sandmann P.**, Untersuchungen zur Stabilität und den Abbauprodukten von Cortico-steroiden in Dermatika, Dissertation Universität München (1999)
- Schäfer-Korting M., Kleuser B., Ahmed M., Höltje H. -D., Korting H. C.**, Glucocorticoids for Human Skin: New Aspects of the Mechanism of Action, *Skin Pharmacol. Physiol.*, 18 (2005) 103-114
- Schmook F. P., Meingassner J. G., Billich A.**, Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, *Int. J. Pharm.*, 14 (2001) 215 (1-2), 51-6
- Schreiner V., Gooris G. S., Pfeiffer S., Lanzendorfer G., Wenck H., Diembeck W., Proksch E., Bouwstra J. A.**, Barrier characteristics of different human skin types investigated with x-ray diffraction, lipid analysis and electron microscopy imaging, *J. Invest. Dermatol.*, 114 (2000) 654-660

- Silva C. L. , Nunes S. C. C., Eusebio M. E. S., Pais A. A. C. C., Sousa J. J. S.,** Thermal Behavior of Human Stratum corneum, *Skin. Pharmacol. Physiol.* 19 (2006) 132-139
- Shu H., Jun H.W.,** Effectiveness and mode of action of isopropyl myristate as a permeation enhancer for naproxen through shed snake skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, 48 (8) (1996) 812-816
- Slivka S. R., Landeen L. K., Zeigler F., Zimmer M. P., Bartel R. L.,** Characterization, barrier function, and drug metabolism of an in vitro skin model, *J. Invest. Dermatol.*, (1993) 40-46
- Slivka S. R.,** Testosterone metabolism in an in vitro skin model, *Cell. Biol. Toxicol.*, (1992) 267-276
- Smith E. W., Maibach H. I.,** Percutaneous penetration Enhancers, Chapter 9.1, CRC Press, INC. Florida USA (1995)
- Specht C., Stoye I., Müller-Goymann C. C.,** Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46 (1998) 273-278
- Specht C.,** Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen, Dissertation TU Braunschweig (1999)
- Stüning M., Raulf M., König W.,** Die Bedeutung der Arachidonsäure-Metaboliten für die Entzündungsreaktion, *Dermatologie und Rheuma* (1987)
- Swartzendruber D. C., Wertz P. W., Madison K. C., Downing D. T.,** Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope, *J. Invest. Dermatol.*, 88 (1987) 709-713
- Takayasu D.,** Demonstration by a Novel Genetic Technique That Leader Peptidase Is an Essential Enzyme of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 154 (1983) 76-83
- Trommer H., Neubert R. H. H.,** Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration, *Skin. Pharmacol. Physiol.*, 19 (2006) 106-121
- Vadas P., Pruzanski W.,** Phospholipase A2 activation is the pivotal Stepp in the effector pathway of inflammation, Plenum Press, New York (1990) 83-101
- Van Duzee B. F.,** Thermal analysis of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, 65 (1975) 404-408
- Van Hal D. A., Jeremiasse E., Junginger H. E., Spies F., Bouwstra J. A.,** Structure of fully hydrated human stratum corneum: a freeze-fracture electron microscopy study., *J. Invest. Dermatol.*, 106 (1) (1996) 89-95
- Voigt R.,** Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf. 7. überarb. Auflage Berlin: Ullstein Mosby (1993)
- Walker M., Hadgraft J.,** Oleic acid: a membrane 'fluidiser' or fluid within the membrane?, *Int. J. Pharm.*, 71 (1991) R1-R4
- Walker R. B., Smith E. W.,** The role of percutaneous penetration enhancers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 18 (1996) 295-301

- Wassermann K., Müller-Goymann C. C.**, Standardized cultivation of artificial skin constructs for drug permeation studies, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333 (Suppl. 1) (2000) 34 (abstract)
- Wertz P. W., Swartzendruber D. C.**, The composition and morphology of epidermal lipids, *J. Invest. Dermatol.* 89 (1987) 419-425
- Wetz P. W., Swartzendruber D. C., Kitko D. J., Madison K. C., Downing D. T.**, The role of the corneocyte lipid envelope in cohesion of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 93 (1989, a) 169-172
- Wertz P. W., Madison K. C., Downing D. T.**, Covalently bound lipids of human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 92 (1989, b) 109-111
- Wiechers J. W.**, The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs, *Pharm. Weekbl. Sci.* 11 (6) (1989) 185-198
- Wilkes G. L., Nguyen A. L., Wildnauer R.**, Structure-property relations of human and neonatal rat stratum corneum I. Thermal stability of the crystalline lipid structure as Studied by X-ray diffraction and differential thermal analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, 304 (1973) 267-275
- Williams A. C., Barry B. W.**, Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 603-618
- Winkler A., Müller-Goymann C. C.**, Comparative permeation studies for δ -amino-levulinic acid and its n-butyl ester through stratum corneum and artificial skin constructs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53 (2002) 281-287
- Winkler A., Müller-Goymann C. C.**, The influence of topical formulations on the permeation of 5-aminolevulinic acid and its n-butyl ester through excised human stratum corneum, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60 (2005) 427-439
- Wotton K., Mollgaard B., Hadgraft J., Hoelgaard A.**, Vehicle effect on topical drug delivery: effect of Azone on the cutaneous penetration of metronidazole and propylene glycol. *Int. J. Pharmacol.*, 24 (1985) 19-26
- Xu X., Wang R. K.**, Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy, *Phys. Med. Biol.*, 49 (2004) 457-468
- Yamane M. A., Williams A. C., Barry B. W.**, Effects of terpenes and oleic acid as skin penetration enhancers towards 5-fluorouracil as assessed with time; permeation, partitioning and differential scanning calorimetry, *Int. J. Pharm.*, 116 (1995) 231-251
- Yardley H. J., Summerly R.**, Lipid metabolism in normal and diseased epidermis, *Pharmacol. Ther.* 13 (1981) 357-387
- Yazdanian M., Chen E.**, The effect of diethylene glycol monoethyl ether as a vehicle for topical delivery of ivermectin, *Vet. Res. Commun.*, 19 (1995) 309-319
- Zellmer S., Lasch J.**, Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates, *J. Chrom.*, 691 (1997) 321-329

<http://www.hermal.com/webEdition>: Hautstadt.de – Infozentrum Haut- Wissenswertes- Haut
Aufbau

LEBENS LAUF

Ausbildung	09/1993-06/1998	Studium der Pharmazie an der Staatlichen Medizinischen Universität Kazan (Russland) mit anschließender Approbationsprüfung
	05/1997-09/1997	Pharmaziepraktikum bei „Tat.Chim.Preparat“ Kazan (Russland)
	02/1998-06/1998	Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Universität Kazan (Russland)
	08/2002-10/2002	Sprachkurs an der TU Braunschweig mit abschließender DSH-Prüfung
	03/2003-10/2003	Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig, unter Leitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann
	04/2004	Erlangung des akademischen Grades „Diplompharmazeut“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	10/2003-08/2007	Promotionsarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig, unter Leitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann
		Erlangung des Grades „Doktorin der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)“

Wissenschaftliche Veröffentlichungen allgemeiner Art

Diplomarbeit

Neuartige Polymermatrice zur Entwicklung von Transdermalen Therapeutischen Systemen, pharmazeutisch-technologische Charakterisierung und Permeationsuntersuchungen. Halle-Wittenberg, April (2004)

Tagungsbeiträge

S. Mitriaikina, J. Krause, A. Kundratek, J. Klein, C. C. Müller-Goymann, Characterisation of transdermal patches with polymers from growing raw materials. (Poster) International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuremberg (2004)

J. Krause, S. Mitriaikina, A. Kundratek, J. Klein, C.C. Müller-Goymann, Characterisation of patches containing different carbohydrates from growing raw materials for transdermal delivery of diclofenac sodium. (Poster) Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting 2006, Jena (2006)